

Institut für Parasitologie  
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. Peter Deplazes

Arbeit unter Leitung von Dr. Uwe Ulex Müller-Doblies

# **Histopathologische Untersuchung zur Entstehung und Persistenz von Granulomen bei der experimentellen Encephalitozoonose der Ratte**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der  
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

**Kathrin Herzog**

Tierärztin  
von Wölflinswil, Schweiz

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. Peter Deplazes, Referent

Prof. Dr. Felix Ehrensperger, Korreferent

Zürich 2005

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>1</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>2</b>
<b>2. SUMMARY.....</b>	<b>3</b>
<b>3. EINLEITUNG .....</b>	<b>4</b>
<b>4. LITERATURÜBERSICHT.....</b>	<b>5</b>
<b>4.1 ENCEPHALITOOZONOSE .....</b>	<b>5</b>
4.1.1 <i>Taxonomie .....</i>	5
4.1.2 <i>Vorkommen.....</i>	7
4.1.3 <i>Biologie .....</i>	7
4.1.4 <i>Wirt-Parasit-Beziehungen.....</i>	9
4.1.5 <i>Veterinärmedizinische Bedeutung.....</i>	10
4.1.6 <i>Immunantwort .....</i>	12
4.1.7 <i>Histologie .....</i>	15
<b>4.2 GRANULOME UND GRANULOMMODELLE.....</b>	<b>19</b>
4.2.1 <i>Granulombildung und Zusammensetzung eines Granulomes .....</i>	19
4.2.2 <i>Immunabwehr gegen intrazelluläre Parasiten.....</i>	20
4.2.3 <i>Beschreibung ausgewählter Granulome .....</i>	20
4.2.4 <i>Encephalitozoon cuniculi als Granulommodell ? .....</i>	23
<b>5. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>25</b>
<b>5.1 TIERE.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2 GEWEBEVORBEREITUNG UND LÄSIONENZÄHLUNG.....</b>	<b>26</b>
<b>5.3 IMMUNHISTOCHEMISCHE AUSWERTUNG.....</b>	<b>26</b>
5.3.1 <i>Monoklonale und polyklonale Antikörper.....</i>	26
5.3.2 <i>Inkubationsprotokoll für Paraffinschnitte .....</i>	27
<b>5.4 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN.....</b>	<b>28</b>
<b>5.5 ANHANG: CHEMIKALIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER.....</b>	<b>29</b>
<b>6. RESULTATE.....</b>	<b>30</b>
<b>6.1 HISTOLOGIE .....</b>	<b>30</b>
6.1.1 <i>Organlokalisation der durch E. cuniculi-bedingten Läsionen.....</i>	30
6.1.2 <i>Histologische Charakterisierung der Leberläsionen .....</i>	30
6.1.3 <i>Leberläsionen von Lewis-Ratten nach E. cuniculi-Infektion .....</i>	32
6.1.4 <i>Leberläsionen von Brown Norway-Ratten nach E. cuniculi-Infektion .....</i>	33
6.1.5 <i>Histologische Charakterisierung der Lungenläsionen .....</i>	40
<b>6.2 IMMUNHISTOLOGIE.....</b>	<b>41</b>
6.2.1 <i>Verteilung von B-Zellen, Makrophagen und T-Zellen in E. cuniculi-bedingten Leberläsionen.....</i>	41
6.2.2 <i>Verteilung von B-Zellen, Makrophagen und T-Zellen in E. cuniculi-bedingten Lungenläsionen .....</i>	51
<b>7. DISKUSSION .....</b>	<b>52</b>
<b>8. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>
<b>9. DANKSAGUNG.....</b>	<b>69</b>

## 1. Zusammenfassung

*Encephalitozoon cuniculi* ist ein obligat intrazellulärer, einzelliger Parasit, welcher verschiedenste Säugetiere infizieren kann. Kaninchen, Hunde und Nager gelten als potentielle Infektionsquelle für den Menschen. Die Pathogenese der Infektion im Menschen ist nur teilweise bekannt. Mit dem ersten *E. cuniculi*-Feldisolat aus Wanderratten (IPZ:CH-Rat5117) untersucht die vorliegende Studie die Dynamik histopathologischer Läsionen in Lewis und Brown Norway(BN)-Ratten nach oraler Infektion von 80 000 oder 80 infektiösen Sporen. Histopathologisch wurden akute Läsionen in Form von Granulomen in der Leber und in der Lunge gefunden. Nach 4 Wochen waren die Läsionen am deutlichsten, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den Infektionsgruppen ersichtlich waren. Einzig bei BN-Ratten mit hoher Infektionsdosis blieb die Anzahl der Granulome während vier Monate nahezu konstant. Obwohl Parasiten nicht mehr nachweisbar waren. Nach histomorphologischen Kriterien wurden die Granulome nach unterschiedlicher Reife gruppiert. Reife Granulome bei BN-Ratten zeigten einen mehr als 50 % höheren Anteil an Makrophagen (ED1<sup>+</sup>-Zellen) als bei Lewis Ratten, wo CD3<sup>+</sup>-T-Zellen dominierten. Lungenläsionen wurden nur in der akuten Infektionsphase gefunden. Bei BN-Ratten mit hoher Infektionsdosis überwogen in den Läsionen ED1<sup>+</sup>-Zellen. Bei den anderen Versuchsgruppen dominierten CD3<sup>+</sup>-T-Zellen. Diese Studie zeigt, dass eine subklinische Infektion mit *E. culiculi* immunvermittelte Granulome auslösen kann.

## 2. Summary

### **Histopathological study of development and persistence of granuloma in experimental encephalitozoonosis of rats**

*Encephalitozoon cuniculi* is an obligate intracellular microsporidian parasite that infects a large range of mammal species. Rabbits, canids and rodents are potential reservoirs for human infection. The pathogenesis in the mammalian host is poorly understood. This study examines the histopathologic dynamics of the infection with the first *E. cuniculi* isolate (IPZ:CH-Rat5117). Lewis and Brown Norway (BN) rats infected orally with 80000 or 80 infectious spores. Acute lesions were most prevalent in the liver and lung and consisted of granulomas in varying degrees of differentiation. Histopathologic lesions were most extensive four weeks after infection. In contrast to all other groups the liver granulomas in BN-rats that had received the high infectious dose did not resolve over the course of four months despite the parasite load declining to near the detection. The liver lesions were assigned to three different stages based on histomorphologic criteria. Mature granulomas in BN rats showed a > 50 % macrophages (ED1<sup>+</sup>) compared to Lewis rats, in which CD3<sup>+</sup> cells dominated. Lungs lesions were only observed in the acute phase of the infection. In both rats strains infected with the lower dose and in Lewis rats infected with the high dose CD3<sup>+</sup> cells dominated, while ED1<sup>+</sup> cells dominated in the lungs of BN rats infected with the higher infection dose. This study demonstrates that subclinical *E. cuniculi* infection can be trigger immune-mediated granulomas.



### 3. Einleitung

*Encephalitozoon cuniculi* ist ein weitverbreiteter Parasit bei Säugetieren, insbesondere bei Kaninchen, Nagern, Caniden und Menschen. Veterinärmedizinisch ist der obligat intrazelluläre Parasit hauptsächlich beim Kaninchen von Bedeutung, wo Erkrankungen mit neurologischer Symptomatik auftreten. Histopathologisch werden bei chronisch infizierten Tieren granulomatöse Entzündungsherde im Zentralnervensystem, den Nieren, der Lunge und der Leber gesehen (Scharmann et al., 1986).

Infektionen mit *E. cuniculi* bei der Ratte sind nur selten beschrieben worden (Lainson, 1954; Attwood und Sutton, 1965; Canning, 1967; Grobov et al., 1975; Majeed und Zubaidy, 1982). Die Mehrzahl dieser Studien behandeln spontane Infektionen, während experimentelle Infektionen aus den letzten dreissig Jahren nicht bekannt sind. Die Bedeutung von *E. cuniculi* als Infektionserreger in Labortierzuchten ist in den vergangenen Jahren durch verbesserte Hygienemassnahmen in den Hintergrund getreten. Die Ratte eignet sich jedoch zur Untersuchung der immunologischen Vorgänge. Bei peroralen Infektion mit *E. cuniculi* persistieren granulomatöse Läsionen in der Leber von Brown Norway- beziehungsweise Lewis-Ratten bis 150 Tage nach Infektion. Dies im Unterschied zur Situation in der Maus, wo schon wenige Wochen nach Infektion keine Läsionen mehr nachweisbar sind. Parasiten sind nach 150 Infektionstagen jedoch immunhistologisch in den Läsionen nicht mehr detektierbar. Als Hypothese für die weitere Untersuchung wurde angenommen, dass die Morphologie und Zellzusammensetzung der Läsionen Aufschluss darüber gibt, ob eine Läsion autoreaktiver oder protektiver Natur ist.

Ziel dieser Arbeit war es, die Entwicklung der granulomatösen Läsionen im Verlaufe einer experimentellen Infektion der Ratte mit *E. cuniculi* in der Leber und der Lunge zu beschreiben und die Zellzusammensetzung der Granulome in Abhängigkeit der Rasse, der Infektionsdosis und der Dauer der Infektion zu typisieren.

## 4. Literaturübersicht

### 4.1 Encephalitozoonose

#### 4.1.1 Taxonomie

*Encephalitozoon cuniculi* (Levaditi et al., 1923) wird systematisch in die Ordnung Glugeida der Klasse Hapophasea im Stamm Microspora eingeteilt (Sprague et al., 1992). Nebst *E. cuniculi* kann man molekulargenetisch oder immunologisch zwei weitere Spezies der Gattung Encephalitozoon unterscheiden (Tab. 1) (Weiss et al., 1998; Deplazes et al., 2000). *E. cuniculi*, *E. intestinalis* und *E. hellem* können Erkrankungen bei immundefizienten Menschen verursachen (Deplazes et al., 1996). *E. cuniculi* wird weiter in drei verschiedene Stämme eingeteilt (Tab. 2). Anhand von Antigenanalysen und der Anzahl 5'-GTTT-3'-Repeats innerhalb der ITS-Region lassen sich der „Maus-Stamm“ (2 Repeats), „Kaninchen-Stamm“ (3 Repeats) und „Hunde-Stamm“ (4 Repeats) differenzieren (Didier et al., 1995). Ein Isolat, gewonnen aus dem Gehirn einer in der Stadt Zürich gefangenen norwegischen Wanderratte (*Rattus norvegicus*), wurde mittels PCR als „Maus-Stamm“ identifiziert. Durch eine Western-blot-Analyse konnte gezeigt werden, dass dieses Isolat sich jedoch von allen anderen Zwei-Repeat-Isolaten durch eine charakteristische Einzelbande bei 53 kDA unterscheidet (Müller-Doblies et al., 2002).

**Tabelle 1:** Taxonomie der Gattung Encephalitozoon (gemäss Sprague et al., 1992)

<b>Stamm</b>	Microspora	
<b>Klasse</b>	Hapophasea	
<b>Ordnung</b>	Glugeida	
<b>Familie</b>	Encephalitozoonidae	
<b>Gattung</b>	Encephalitozoon	
<b>Art</b>	<i>E. cuniculi</i>	Levaditi et al., 1923 Didier et al., 1995
	<i>E. intestinalis</i> (= <i>Septata intestinalis</i> )	Cali et al., 1993 Weiss et al., 1994 Hartskeerl et al., 1995
	<i>E. hellem</i>	Didier et al., 1991

**Tabelle 2:** Wirte und geographische Verbreitung der *E. cuniculi*-Stämme (modifiziert nach Deplazes et al., 2000)

<b><i>E. cuniuli</i>-Stamm</b>	<b>Tierart</b>	<b>Geographische Verbreitung</b>	<b>Referenz</b>
<b>„Kaninchen-Stamm“</b> (1-Repeat) (Typ I)	<b>Kaninchen</b>	<b>Schweiz</b>	Müller, 1998 Mathis et al., 1997
		<b>USA</b>	Katiyar et al., 1995 Didier et al., 1995
		<b>Deutschland, Australien, Italien</b>	Deplazes und Mathis, unpublizierte Resultate
	<b>Mensch</b>	<b>Schweiz</b>	Weber et al., 1997 Deplazes et al., 1996 Mathis et al., 1998
		<b>Italien</b>	Rossi, 1998
<b>„Maus-Stamm“</b> (2-Repeat) (Typ II)	<b>Maus</b>	<b>Tschechische Republik Grossbritannien</b>	Didier et al., 1995
	<b>Norwegischer Blaufuchs (<i>Alopex lagopus</i>)</b>	<b>Norwegen, Finnland</b>	Mathis et al., 1996 Akerstedt et al., 2002
	<b>Ratte</b>	<b>Schweiz</b>	Müller-Doblies et al., 2002 Mathis et al., 1998
<b>„Hunde-Stamm“</b> (4-Repeat) (Typ III)	<b>Hund</b>	<b>USA</b>	Didier et al., 1995
		<b>Südafrika</b>	Hollister et al., 1996
	<b>Kaiserschnurrbarttamarin (<i>Saguinus imperator</i>)</b>	<b>Schweiz</b>	Guscetti et al., 2003 Wenker et al., 2002
	<b>Springtamarin (<i>Callimico goeldi</i>) Löwenäffchen (<i>Leontopithecus rosalia</i>)</b>	<b>Schweiz</b>	Wenker et al, 2002
	<b>Mensch</b>	<b>USA</b>	Mertens et al., 1997 Didier et al., 1996
		<b>Mexiko</b>	Mathis et al., 1997
		<b>Grossbritannien</b>	Hollister et al., 1995

### 4.1.2 Vorkommen

Seit der Erstbeschreibung von *E. cuniculi* beim Kaninchen (Levaditi et al., 1923) konnte diese Art bei den verschiedensten Tierarten nachgewiesen werden. Ausser Kaninchen (Robinson, 1954; Cox et al., 1979) sind auch Nagetiere, unter anderem wilde Mäuse (Kouchakji, 1985), Labormäuse (Shaddock und Pakes, 1971), Ratten (Lainson, 1954; Canning, 1967), Hamster (Pakes et al., 1975) und Meerschweinchen (Boot et al., 1988) empfänglich. Berichte über Erkrankungen von Karnivoren stammen hauptsächlich aus Skandinavien, wie beispielsweise bei Farmfüchsen (Nordstoga, 1972) oder Nerzen (Bjerkas, 1990) und aus Südafrika bei Hunden (Botha et al., 1986; Stewart und Botha, 1989) und einer Katze (Van Rensburg und Du Plessis, 1971). Ins Zentrum des Interesses ist dieser Parasit als opportunistischer Krankheitserreger bei HIV-positiven Menschen gelangt (Weber et al., 2000). Gleichfalls können andere Primaten betroffen sein (Didier et al., 1994; Guscetti et al., 2003, Wenker et al., 2002).

### 4.1.3 Biologie

Der Lebenszyklus von Microsporidien lässt sich in 5 Stadien gliedern und findet intrazellulär statt:

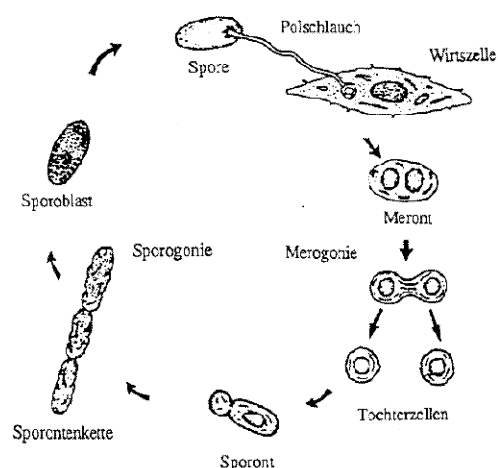


Abb.1 Entwicklungszyklus von *E. cuniculi* (Desser et al., 1992)

Die **Übertragung** von *Encephalitozoon* kann horizontal oder bei einigen Spezies auch vertikal stattfinden. Menschen infizieren sich entweder peroral mit Sporen über kontaminierte Nahrung und Wasser oder vermutlich auch über Inhalation von Sporen (Desportes-Livage, 2000) beziehungsweise durch direkten Kontakt bei Schmierinfektionen des Auges mit *E. hellem*. Sporen können beim Menschen in Urin, Kot, Sputum und bronchoalveolärer Flüssigkeit nachgewiesen werden (Weber et al., 2000; del Aguila et al., 2001). Bei hohem Infektionsdruck beziehungsweise grosser Populationsdichte kann sich die Infektion endemisch halten, wie beispielsweise bei Labortierhaltungen oder Tierfarmen (Desportes-Livage, 2000). Eine vertikale Übertragung ist bei Füchsen und bei Kaninchen beschrieben und wird auch bei Hunden, Totenkopffäffchen (*Saimiri sciureus*) und anderen Primaten vermutet (Mohn et al., 1974; Zeman und Baskin, 1985; Stewart und Botha, 1989; Guscetti et al., 1998).

Unter **Germination** versteht man die Ausstülpung des Polschlauches und die Infektion der Zelle durch Entlassen des Sporoplasmas in die Zelle. Es ist jedoch auch möglich, dass Microsporidien durch Phagozytose in die Zellen aufgenommen werden (Didier, 1998). In vitro wurde gezeigt, dass die Germination nur unter optimalen Umweltbedingungen, das heisst einer pH-Änderung, idealem osmotischen Druck und einer genügend hohen Calcium-Konzentration stattfinden kann (Pleshinger und Weidner, 1985; Weidner et al., 1999; Couzin et al., 2000).

**Merogonie** ist die proliferative Phase der Reproduktion. *Encephalitozoon spp.* vermehren sich intrazellulär durch Zweiteilung in einer parasitophoren Vakuole (Didier, 1998).

Bei der **Sporogonie** entstehen durch eine einfache Kernteilung, gefolgt von Zweiteilung der Zelle bei *Encephalitozoon spp.* Sporoblasten.

Sporoblasten reifen in einer **Maturationsphase** zu Sporen mit ausgebildeten Organellen.

#### 4.1.4 Wirt-Parasit-Beziehungen

Entscheidend für eine Erkrankung, beziehungsweise den Verlauf einer Infektion, ist der Immunstatus des Wirtes respektive die Stärke des Infektionsdruckes (Desportes-Livage, 2000). Am häufigsten wird eine **chronische, subklinische Erkrankung** beobachtet. Bei den meisten Tierarten kommt diese Form bei adulten, immunkompetenten Individuen vor (Shadduck und Pakes, 1971). Auch eine experimentelle Infektion bei neonatalen Mäusen führt zu keinem anderen Krankheitsverlauf (Liu et al., 1988).

Jungtiere von Karnivoren hingegen zeigen nach **diaplazentarer oder früher postnataler Infektion** einen fulminanten Krankheitsverlauf mit meistens letalem Ausgang (Nordstoga, 1972). In diesen Fällen ist eine Hypergammaglobulinämie zu beobachten, und eine Hypersensibilität Typ III wird vermutet (Botha et al., 1986). Daraus kann ein Nierenversagen mit tödlichem Verlauf entstehen (Zhou und Nordstoga, 1993). Den gleichen Krankheitsverlauf mit tödlichen Ausgang fand man bei jungen, bis zu mehreren Monaten alten, Kaiserschnurrbartamarinen (*Saguinus imperator*) des Züricher Zoos (Guscetti et al., 2003; Deplazes et al., 2000). Ebenfalls mit einer **klinischen Erkrankung** reagieren mit *E. cuniculi* infizierte immundefiziente Individuen, beispielsweise HIV-positive Menschen. Die Schwere der Erkrankung ist dabei abhängig vom Immunstatus des Patienten (Weber und Bryan, 1994). Die gleiche Aussage gilt auch für Mäuse. Eine schwere Immundefizienz wie sie beispielsweise bei SCID-Mäusen (severe combined immunodeficient) oder IFN $\gamma$ -Knockout (KO)-Mäusen vorliegt, kann bewirken, dass eine Infektion mit *E. cuniculi* letal verläuft (Gannon, 1980; Koudela et al., 1993).

Bei immunkompetenten Kaninchen kann eine Infektion mit *E. cuniculi* über längere Zeit subklinisch bleiben. Warum plötzlich klinische Symptome, wie beispielsweise zentralnervöse Störungen auftreten, ist weitgehend ungeklärt. Auch bei asymptomatisch infizierten Kaninchen werden typische Läsionen im ZNS gefunden (Scharmann et al., 1986). Vermutet werden äussere Einflüsse, wie zum Beispiel Stress oder Glucocorticoid-Verabreichung. Bei Mäusen kann eine latente Infektion durch Gabe von Cortison reaktiviert werden (Innes et al., 1962).

#### 4.1.5 Veterinärmedizinische Bedeutung

In der Veterinärmedizin sind hauptsächlich Erkrankungen von Kaninchen von Bedeutung. 1998 waren in der Schweiz 7.5 % von 292 gesunden Kaninchen und 85 % von 72 Kaninchen mit neurologischer Symptomatik serologisch positiv (Müller, 1998). Im Sektionsgut der Jahre 1982 – 1991 konnte histopathologisch bei 1.1 % aller Kaninchen diese Verdachtsdiagnose gestellt werden (Hoop et al., 1993). Die Bedeutung der Encephalitozoonose in der Schweiz ist in den letzten Jahren unverändert geblieben. Am Institut für Parasitologie der Universität Zürich werden zunehmend Serumproben auf das Vorkommen spezifischer Antikörper untersucht. In den Jahren 1996 bis 2001 konnte durchschnittlich bei mehr als 75 % aller untersuchten Seren ein positiver Titer festgestellt werden (Tab. 3).

**Tabelle 3:** Routinemässig auf *E. cuniculi* (IFAT) untersuchte Serumproben von Kaninchen am Institut für Parasitologie (IPZ) der Universität Zürich während den Jahren 1996 –2001.

<b>Jahr</b>	<b>Anzahl Proben</b>	<b>Positive Ergebnisse</b>	
1996	53	43	81,1 %
1997	100	66	66,0 %
1998	119	101	84,9 %
1999	133	102	76,7 %
2000	136	107	78,7 %
2001	226	175	77,4 %

Encephalitozoonose ist eine zumeist chronische Erkrankung. Die Parasiten können über Jahre im Wirt persistieren, ohne dass klinische Symptome auftreten. Die meisten serologisch positiven Kaninchen zeigen im Verlaufe ihres Lebens jedoch Symptome einer akuten Encephalitozoonose. Kaninchen infizieren sich hauptsächlich peroral durch die Aufnahme von Sporen, eine intrauterine Übertragung ist jedoch auch beschrieben (Canning und Lom, 1986). In der Praxis werden betroffene Kaninchen mit Kopfschiefhaltung, Ataxien, Paralyse und anderen Störungen des Zentralnervensystems vorgestellt. Labordiagnostisch sind als Korrelat zu einer interstitiellen Nephritis häufig zusätzlich Harnstoff und Kreatinin erhöht. Weiter werden auch Fälle von phakoklastischer Uveitis beschrieben (Ewringmann, 1998). Die Diagnose wird daraufhin serologisch mittels IFAT oder ELISA gestellt, wobei die Antikörper auch bei asymptomatischen Tieren über Jahre persistieren können (Scharmann et al., 1986; Müller, 1998). Wir konnten jedoch zeigen, dass bei asymptomatischen Kaninchen der IgM-Titer deutlich niedriger ist als bei symptomatisch erkrankten Tieren (Daten nicht gezeigt).

Die Behandlung der betroffenen Kaninchen richtet sich einerseits gegen den Parasiten, andererseits werden entzündliche Vorgänge, welche die Symptomatik hervorrufen, begleitend unterdrückt. Die antiparasitische Wirkung wird durch Fenbendazol (Panacur®) erreicht, welches täglich über 4 Wochen verabreicht wird. Bewährt hat sich dabei eine perorale Gabe von mit Fenbendazol (20 mg/kg Körpergewicht pro Tag) angereicherten Pellets (Suter et al., 2001). Bei eigenen Untersuchungen von sechs Kaninchen waren nach vierwöchiger Behandlung mit Panacur® angereichertem Futter vier Tiere asymptomatisch, ein Kaninchen zeigte vorübergehende Restsymptomatik mit leichter Kopfschiefhaltung und ein Tier wurde kurz nach Behandlungsbeginn getötet (Daten nicht gezeigt). Zur Hemmung der entzündlichen Vorgänge im Gehirn können Glucocorticosteroide, wie Dexamethason, eingesetzt werden. Zu beachten gilt, dass die Dosis im antiphlogistischen Bereich liegt. Eine zu hohe Dosis an Steroiden kann immunsupprimierend wirken und das Auftreten von Symptomen begünstigen.

Ebenfalls scheint die Gabe von mit Fenbendazol angereichertem Futter zur Verhinderung einer Infektion zu genügen. Eine prophylaktische Gabe von solchem Futter während 4 Wochen verhinderte eine experimentelle, perorale Infektion (Suter et al., 2001).



In der Schweiz scheint Encephalitozoonose bei Karnivoren kaum von Bedeutung zu sein. Dagegen wurde ein Encephalitis-Nephritis-Syndrom in Südafrika und Skandinavien (Nordstoga, 1972; Stewart und Botha, 1989; Müller, 1998) beziehungsweise Tansania (Plowright, 1952; Plowright und Yeoman, 1952) und den USA (Snowden et al., 1999) beschrieben. In der Schweiz konnte weder symptomatisch noch histopathologisch jemals diese Diagnose gestellt werden. In der Dissertation von Müller (1998) wurden unter anderem 212 Hunde, 45 Katzen und 86 Füchse serologisch auf das Vorkommen spezifischer Antikörper gegen *E. cuniculi* untersucht. Einzig bei einer Katze wurde ein positiver IFAT-Titer festgestellt. Zusätzlich ist zu beachten, dass in Mitteleuropa Erkrankungen bei Menschen durch den „Kaninchen-Stamm“ bedingt sind, während in den USA Infektionen mit dem „Hunde-Stamm“ bei HIV-positiven Menschen häufiger sind (Mathis, 2000). Der „Hunde-Stamm“ konnte bisher in der Schweiz in einer Kolonie von Kaiserschnurrbarttamarinen des Züricher Zoos isoliert werden (Guscetti et al., 2003). In der Folge wurde dieser auch bei Springtamarinen und Löwenäffchen (Wenker et al., 2002) nachgewiesen.

Die Bedeutung von *E. cuniculi*-Infektionen bei Nagetieren hat in den letzten Jahren deutlich abgenommen. Hohe Hygienestandards in den Labortierzuchten haben die Prävalenz massiv reduziert. Die Bedeutung in der Heimtierhaltung ist fraglich (Deplazes et al., 2000). Serologische Diagnostik für Meerschweinchen, Mäuse und Ratten wird angeboten und gelegentlich nachgefragt.

#### 4.1.6 Immunantwort

##### **Zelluläre Immunantwort:**

Die zentrale Rolle der **zellulären Immunabwehr** gegen eine Infektion mit *E. cuniculi* wurde in diversen Studien im Mausmodell aufgezeigt. Der Transfer einer schützenden Immunität ist durch Übertragung von sensibilisierten Milzzellen möglich. Hingegen hatte die Übertragung von Serumantikörpern von infizierten Mäusen auf naive Mäuse keinen Einfluss auf die Ausbildung einer experimentellen Infektion (Schmidt und Shadduck, 1983).

Natürliche Killerzellen (NK) scheinen eine bedeutende Rolle in der frühen Abwehr zu haben. In vitro zeigen diese eine erhöhte Aktivität nach Exposition mit *E. cuniculi*. Die durch diese

Zellen vermittelte Zytotoxizität erreicht nach 3-4 Tagen höchste Aktivität. Nach 21 Tagen ist die Aktivität der NK-Zellen wieder im Normalbereich. Diese Aktivität alleine reicht aber nicht aus, um die Infektion zu überwinden (Niederkorn et al., 1983).

Auch bei *E. intestinalis* und *E. hellem* lässt sich ein ähnlicher Mechanismus feststellen (Achbarou et al., 1996). Es wurde gezeigt, dass Stickoxid-Donoren diese Arten bei der Germination hemmen können (He et al., 1996). Stickoxide (NO) sollen bei der Parasitenzerstörung eine entscheidende Rolle spielen. In vitro sieht man, dass Lipopolysaccharid (LPS) und IFN $\gamma$  die Replikation und somit auch die Anzahl Parasiten in Makrophagen reduzieren können. IFN $\gamma$  allein scheint nur mikrobiostatisch zu wirken im Gegensatz zur Kombination mit LPS (Didier, 1995). Interessanterweise hat Tumornekrosefaktor alpha (TNF $\alpha$ ) in der gleichen Versuchsanordnung keine analoge Wirkung. Der Effekt der Replikationshemmung beruht auf einem Arginin-abhängigen Mechanismus. Durch die Gabe von NMMA, einem L-Arginin-Analog, kann die Produktion von NO und damit dessen mikrobiozide Wirkung blockiert werden (Didier und Shaddock, 1994).

Die neuere Forschung zeigt jedoch, dass die erfolgreiche Abwehr gegen *E. cuniculi* in Mäusen unabhängig von NO-Induktion erfolgt. Induzierbare Nitridoxid-Synthetase (iNOS)-knock-out (KO)-Mäuse zeigen keinen Unterschied gegenüber dem Wildtyp in bezug auf die Abwehr von *E. cuniculi* (Khan und Moretto, 1999). Vielmehr scheint IFN $\gamma$  entscheidend zu sein für die Induktion einer CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort. Eine adäquate CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort scheint limitierend für das Überstehen einer Infektion mit diesem Parasiten zu sein. Sowohl CD8<sup>+</sup>- (Braunfuchsova et al., 2001), wie auch Perforin-KO-Mäuse erliegen einer *E. cuniculi*-Infektion, während CD4<sup>+</sup>-KO-Mäuse die Infektion ohne sichtbare Erkrankung überstehen. Ebenfalls letal verläuft die Infektion bei IFN $\gamma$ -KO-Mäusen, wobei diese länger als die CD8<sup>+</sup>-KO-Mäuse überleben (Moretto et al., 2000).

Für die Koordination einer erfolgreichen T-Zell-Antwort sind verschiedene Zytokine verantwortlich. Braunfuchsova untersuchte 1999 IFN $\gamma$ , Interleukin 10 (IL-10) und Interleukin 12 (IL-12) im Serum, in Milzzellen und in peritonealen Exsudatzellen (PEC). In Balb/c-Mäusen steigt IFN $\gamma$  ab dem 11. Tag nach Inokultation an und erreicht am 15. Tag ein erstes Maximum. Bei SCID-Mäusen findet dieser Effekt vier Tage früher statt. Gleichzeitig konnte bei letzteren ein permanent ansteigender Spiegel von IL-12 beobachtet werden. IL-12

stimuliert NK-Zellen und T-Zellen zur Produktion von IFN $\gamma$ . IL-10 konnte bei Balb/c-Mäusen aber nicht bei SCID-Mäusen vermehrt nachgewiesen werden. Dies steht im Einklang mit Beobachtungen, dass IL-10 von T-Zellen als Reaktion auf IL-12 produziert wird und die IL-12 Produktion im Sinne einer negativen Rückkopplung hemmt (Koch et al., 1996). Diese negative Rückkopplungs-schleife entfällt bedingt durch das Fehlen von Lymphozyten in SCID-Mäusen so dass die IFN $\gamma$ -Spiegel früher ein Maximum erreichen und die IL-12-Spiegel im gleichen Zeitraum monoton steigen (Braunfuchsova et al., 1999).

### **Humorale Immunantwort:**

Die Infektion mit *E. cuniculi* provoziert unter experimentellen Bedingungen eine sehr ausgeprägte **humorale Immunantwort**. Diese setzt je nach Dosis und Applikationsart sehr rasch ein. Im Serum von Kaninchen ist IgG, je nach Applikationsart, nach 7 (intravenöse Applikation) beziehungsweise 14-21 Tagen (peroral) nachweisbar (Waller et al., 1978). In einer anderen Studie mit deutlich niedrigeren Infektionsdosen zeigten Kaninchen 3-6 Wochen nach peroraler Infektion spezifische Antikörper im IFAT (Müller, 1998). Der IgG-Titer bleibt in Kaninchen lebenslang erhöht (Schmidt und Shadduck, 1983), was als Persistenz des Parasiten gedeutet wird. Die Antikörper haben keine protektive Wirkung (Schmidt und Shadduck, 1983). Serologische Kreuzreaktionen zu Protozoen wurden nicht gefunden (Wosu et al., 1977), sind aber innerhalb der Gattung Encephalitozoon von Bedeutung. Sie sind vor allem durch die Polschlauch- und Sporenantigene bedingt (Croppo et al., 1997; Enriquez et al., 1997).

Bei einer *E. cuniculi*-Infektion wird nebst IgG- auch IgM-Bildung induziert.

Bei symptomlosen Kaninchen fiel der IgM-Titer im Laufe der Infektion wieder ab (Kunstyr et al., 1986). Ein ähnlicher Titerverlauf wurde auch bei C57/BL6 –Mäusen beobachtet. Nach einem IgM-Peak um den 29. Tag post infectionem fällt der Titer innerhalb von 17 Monaten auf ein Hintergrundniveau ab (Gannon, 1980).

#### 4.1.7 Histologie

##### **Ratten:**

Bei der Ratte wurden hauptsächlich in Gehirn, Leber und Nieren Läsionen gefunden. Granulomatöse Foci im Zentralnervensystem (ZNS) von Albino-Ratten bestehen aus Epitheloidzellen, umgeben von einigen Lymphozyten, während Riesenzellen und Nekrose fehlen. In 3,8% der Foci konnten Parasiten nachgewiesen werden (Attwood und Sutton, 1965). Im Unterschied dazu werden bei Wistar-Ratten auch Riesenzellen beschrieben (Majeed und Zubaidy, 1982). Ein ähnliches Bild hat auch Canning (1967) gezeigt: Sie beschreibt Läsionen von mit *E. cuniculi* infizierten Ratten der London School of Hygiene & Tropical medicine. Sie entdeckte weiter Parasiten in der Medulla der Niere umgeben von einer minimalen zellulären Reaktion. Ausserdem fand sie Parasiten in Zellen von grossen Blutgefässen der Leber und in Hepatozyten. In den Portalfeldern war eine lymphozytäre Infiltration vorhanden. Ebenfalls wurde der Parasit in Epithelzellen der Bronchien und Alveolen gefunden.

##### **Kaninchen:**

Beim Kaninchen werden ähnliche Läsionen im Zentralnervensystem beschrieben wie bei der Ratte. Im Gegensatz zur Ratte werden beim Kaninchen auch zentrale Nekrose und Rundzellinfiltrate im Cortex und den Meningen erwähnt (Robinson, 1954; Shadduck et al., 1979). Typischerweise sind die Nieren deutlich verändert. Eine interstitielle Nephritis mit lymphozytären Granulomen scheint eine charakteristische Läsion bei dieser Tierart zu sein (Scharmann et al., 1986). Ferner werden bei Kaninchen Veränderungen in Lunge, Herz und Leber gesehen. Zusätzlich werden lympho-monozytäre Infiltrate in den Portalfeldern der Leber beschrieben (Robinson, 1954; Fuentealba et al., 1992).

Kaninchen zeigen unterschiedliche Organverteilung und Schweregrad in Abhängigkeit vom Infektionszeitpunkt in einem Experiment von Cox et al. (1979). Die Läsionen sind vergleichbar mit den zuvor beschriebenen. Im Frühstadium, das heisst nach 31 Infektionstagen, finden sich Läsionen hauptsächlich in Leber und Gehirn, weniger betroffen sind Niere und Lunge. Nach 98 Infektionstagen erscheinen die Veränderungen stärker in der Niere und schwächer in Lunge und Leber. Zusätzlich werden auch im Herz Foci gefunden. Mittels direkter Immunfluoreszenz können die Parasiten am Anfang der Infektion vor allem in Niere und Lunge, weniger in der Leber nachgewiesen werden. Später lassen sich Parasiten nur noch vereinzelt im Herz finden. Interessanterweise sind die Veränderungen abhängig von der Applikationsart. Bei intratrachealer Applikation werden ausgeprägte Veränderungen in Lunge und Leber gefunden. Es können aber keine Parasiten in den Läsionen nachgewiesen werden.

### **Karnivoren:**

Bei Karnivoren ist nebst einem horizontalen Übertragungsweg auch eine diaplazentare Infektion beschrieben. Die natürlich infizierten Hundewelpen zeigen kurz nach der Geburt ZNS-Symptomatik (Botha et al., 1979). In der Regel verlaufen diese Infektionen letal, wobei die Muttertiere nicht erkranken. Die betroffenen Jungtiere haben massivste Läsionen, welche sich makroskopisch als eine weisse Granulierung der Nierenoberfläche manifestieren. Ähnliche Veränderungen werden auch in der Leber gefunden. Zudem beobachtet man in der Niere vereinzelt Petechien, Nierenvergrösserungen und Fibrose. Histologisch ist der Nierenkortex mit mononukleären Zellen, vor allem Plasmazellen, infiltriert (Nordstoga, 1972). Des weiteren finden sich, wie beim Kaninchen, ähnliche granulomatöse Herde, in Gehirn, Leber und Herz. Es wird vermutet, dass den typischen arteriellen Läsionen eine immunologische Pathogenese zugrunde liegt (Nordstoga, 1972; Botha et al., 1986). Diese Annahme wird unterstützt durch die auftretende Hypergammaglobulinämie (Nordstoga, 1972; Arnesen und Nordstoga, 1977). Auch bei Karnivoren sind die Veränderungen in Abhängigkeit des Infektionsweges unterschiedlich.

Beispielsweise ist die Nephritis deutlicher ausgeprägt bei einer intravenösen Inokulation, im Vergleich zur peroralen Applikation. Bei allen Arten von Übertragung wird aber eine interstitielle Pneumonie beobachtet (Botha et al., 1986).

Van Heerdens et al. (1989) beschreiben *E. cuniculi*-Infektionen bei afrikanischen Wildhunden (*Lycaon pictus*) mit massivsten Läsionen sowohl im Gehirn wie auch Niere, Lunge und Darm.

Es lässt sich jedoch in dieser Arbeit nicht ausschliessen, dass diese Läsionen durch eine vorangegangene Staupe-Impfung mit Lebendimpfstoff bedingt oder zumindest verstärkt worden sind. Die vorangehend beschriebenen Läsionen werden bei diaplazentar infizierten und daher noch nicht immunkompetenten Jungtieren beobachtet. Bei adulten Karnivoren findet man die oben genannten histologischen Läsionen in abgeschwächtem Masse. In histologischen Präparaten wurde eine subakute, multifokale, granulomatöse vorwiegend plasmazelluläre Nepritis gefunden. Nekrotische Bezirke sind häufig. Parasiten konnten aber nur selten in den Läsionen nachgewiesen werden. Bei adulten Tieren kommt es zu keiner symptomatischen Erkrankung (Mc Innes und Stewart, 1991).

Bei experimentell infizierten, neonatalen Hunden ist eine vergleichbare Symptomatik, sowie ein ähnliches histopathologisches Bild wie bei natürlich infizierten Tieren beobachtbar.

Zusätzlich fanden Szabo und Shaddock (1987) eine Lymphadenopathie mit Hyperplasie des germinativen Zentrums zudem ist die Milz durch eine Hyperplasie der Follikel vergrössert. In Abhängigkeit der Infektionsdauer sind in der späten Infektionsphase (60 Tage p.i.) selten Parasiten in den Organen nachweisbar. In der Frühphase der Infektion befanden sich bei einem akut infizierten Boxerwelpen viele Sporen in den Nierenepithelien, im Tubuluslumen, in den glomerulären Kapillaren, in der Bowman-Kapsel, im Interstitium und in Gefässlumina (McCully et al., 1978). Mittels elektronenmikroskopischer Untersuchungen liess sich die Lokalisation lebender *E. cuniculi*-Sporen feststellen (Van Dellen et al., 1978). Die Sporen waren primär mit Endothelzellen assoziiert. In der akuten Krankheitsphase wurden deutlich mehr lebende Sporen gefunden. In der Leber waren die Sporen in diversen Lokalisationen zu sehen, unter anderem in Endothelzellen, Hepatozyten und Kupfferschen-Sternzellen. Nur bei freien Sporen war eine granulomatöse Reaktion mit Plasmazellen, Lymphozyten und Epitheloidzellen deutlich erkennbar.

### **Mäuse:**

Daten zu den histopathologischen Veränderungen in Mäusen beruhen entweder auf mit *E. cuniculi* experimentell infizierten Mäusen oder auf sporadischen, natürlichen Infektionen von Labormäusen, deren histopathologisches Bild auf Encephalitozoonose schliessen lassen.

Bei Inzuchtstämmen, ist die Empfänglichkeit eines Stammes zu berücksichtigen: So gelten DBA/1-Mäuse und C57BL/6-Mäuse als empfänglicher, Balb/c-Mäuse als resistent (Niederborn et al., 1981). Unabhängig von Alter und Übertragungsweg entsteht bei Balb/c-

Mäusen eine chronische Infektion, was persistierende Antikörper-Titer beweisen (Liu et al., 1988). Entscheidend für Symptomatik und Krankheitsverlauf ist auch der Immunstatus. SCID-Mäuse beispielsweise zeigen Symptomatik in Form einer Hepato-Splenomegalie, Aszites und eines erweiterten Dickdarmmlumen. Durch den Mangel an T- und B-Zellen verläuft die Erkrankung letal. Intraperitoneal infizierte Tiere sterben im Durchschnitt nach 20,2 Tagen, nach peroraler Verabreichung jedoch erst nach 34 Tagen. Histologisch werden im Darm Mukosaneukrosen und in den parenchymatösen Organen Granulome gefunden (Koudela et al., 1993). Unabhängig vom Mäusestamm zeigen die Tiere eine mehr oder weniger starke Splenomegalie. Nach Didier (1998) bleibt das Verhältnis von T- und B-Lymphozyten und Makrophagen in der Milz konstant.

Eine Arbeit von Khan et al. (1999) vergleicht die Läsionen von C57BL/6 Wildtyp-Mäusen und CD8-KO-Tieren 14 Tage nach intraperitonealer Infektion, wobei die CD8-KO symptomatisch erkranken und im Durchschnitt 15-20 Tage nach Infektion sterben. Histologisch enthielten die Milzen von infizierten KO-Mäuse nekrotische Areale in der weissen Pulpa, und die Zellpopulationen waren zu Gunsten der mononukleären Zellen verschoben. In der Leber findet man Granulome mit vorwiegend monozytären Zellen und Nekrose. Parasiten konnten nur in Leber und Milz nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Wildtyp-Mäuse einzig eine milde Entzündung in der Leber mit kleinen Lymphozyten und wenigen Monozyten. In der Milz waren nur minimale Hinweise auf eine Entzündung zu finden.

Die Verteilung der Läsionen in den einzelnen Organen ist auch bei dieser Spezies abhängig von der Infektionsdauer. In der frühen Phase werden bei C57BL6-Mäusen Mikrogranulome als fokale lymphozytäre Infiltration in der Leber gefunden, später auch in Gehirn und Lunge und zuletzt in Niere und Herz (El Naas et al., 1999). Eine ähnliche Zeitabhängigkeit zeigt auch Gannon (1980). Er weist nach 14 Infektionstagen in C57BL/6-Mäusen Sporen und Lymphozyten in der Leber nach. Die Läsion vergrößert sich mit zunehmender Infektionsdauer und enthält später auch Epitheloidzellen und nekrotische Hepatozyten. Erste Läsionen im Gehirn waren jedoch erst 22 Tage nach Infektion sichtbar.

## **Mensch:**

Beim Menschen verlaufen Infektionen mit *E. cuniculi* in der Regel symptomlos, es findet lediglich eine Serokonversion statt. Bei 5-13 % einer Patientengruppe mit neurologischen oder renalen Störungen konnten Antikörper nachgewiesen werden, respektive bei 2-5 % gesunder Individuen (Bergquist et al., 1984; Hollister et al., 1991; Kucerova-Pospisilova und Ditrich, 1998). Bei immundefizienten Patienten kann eine Infektion jedoch zu schweren Erkrankungen führen. Eindeutig gesicherte *E. cuniculi*-Infektionen sind selten beschrieben, da einzig mittels molekularen Analysen zwischen *E. cuniculi*- und *E. hellem*-Infektionen differenziert werden kann. Parasiten wurden im Gehirn (Deplazes et al., 1996; Mertens et al., 1997; Weber et al., 1997) und in den Atemwegen (De Groote et al., 1995; Deplazes et al., 1996; Mertens et al., 1997) gefunden. Ausserdem wurden Parasiten in Herz, Nieren, Nebennieren und Blase nachgewiesen (Mertens et al., 1997). Aus dem Urin symptomloser HIV-positiver Menschen konnten Parasiten isoliert und charakterisiert werden (Deplazes et al., 1996).

Weiter wurden aufgrund morphologischer Kriterien Infektionen mit *Encephalitozoon spp.* im ZNS (Matsubayashi et al., 1959), in serösen Häuten, wie beispielsweise dem Peritoneum (Margileth et al., 1973; Zender et al., 1989) und in der Leber (Terada et al., 1987) beschrieben. Histologisch konnten bei einem 35-jährigen HIV-positiven Mann in der Leber zuerst Mikrogranulome gefunden werden, welche sich später zu granulomatösen Läsionen mit suppurativer Nekrose entwickelten. Die Läsionen waren hauptsächlich in den Portalgebieten lokalisiert (Terada et al., 1987).

## **4.2 Granulome und Granulommodelle**

### **4.2.1 Granulombildung und Zusammensetzung eines Granulomes**

Die Granulombildung beruht auf einer komplexen Interaktion zwischen T-Zellen, Zytokinen und Makrophagen. Ist ein Fremdkörper, beziehungsweise ein immunologischer Reiz, resistent gegenüber der Abwehr des Wirtes, kommt es zu einer T-Zell-Akkumulierung mit anschliessender Zytokinausschüttung. Makrophagen aggregieren und proliferieren in der Umgebung des Stimulus. Es kommt zur Bildung eines Granulomes, bestehend aus zentral



gelegenen aktivierten Makrophagen, Epitheloidzellen und mehrkernigen Riesenzellen. Im Falle eines immunologisch bedingten Granulomes ist dieses durch einen Saum von Lymphozyten umgeben. Diese fehlen bei Fremdkörpergranulomen (Roitt, 1984).

#### 4.2.2 Immunabwehr gegen intrazelluläre Parasiten

Die Lokalisation eines Antigens innerhalb der Zelle bedingt die Ausrichtung einer Immunantwort. Klassischerweise werden im Zytoplasma lokalisierte Antigene an MHC-I gebunden und  $CD8^+$ -T-Zellen präsentiert. Diese sind nach Aktivierung zu direkter Zytotoxizität befähigt. Die infizierte Zelle wird durch Perforin oder Granzyme zerstört und mit ihr der obligat intrazelluläre Parasit. Daneben können sie durch Zytokine andere Effektorzellen mobilisieren. Befinden sich die Antigene in Endosomen, erfolgt die Antigenpräsentation über MHC-II-Moleküle an  $CD4^+$ -T-Zellen.

$CD4^+$ -T-Zellen gliedern sich in zwei unterschiedliche funktionelle Klassen: Th1-Zellen führen über Makrophagenaktivierung, NK-T-Zellen oder zytotoxische T-Zellen zum Abbau des Agens. Den Gegensatz dazu bilden Th2-Zellen, welche zu einer B-Zellaktivierung anregen (Griffiths, 1995). Die Induktion einer überwiegend Th1- oder Th2-Immunantwort entsteht durch die entsprechende Zytokine (Kamogawa et al., 1993).

$IFN\gamma$  und IL-12 gelten als Th1-Induktoren (Maggi et al., 1992). Th1-Zellen produzieren ihrerseits ebenfalls  $IFN\gamma$ , welches die Aufgabe übernimmt, Makrophagen zu aktivieren und somit zytotoxische Mechanismen auszulösen. IL-4 bewirkt unter anderem eine Th2-Differenzierung (Swain et al., 1990). Ebenso steuern IL-10, IL-5 und weitere Zytokine die Immunantwort in Richtung Th2.

#### 4.2.3 Beschreibung ausgewählter Granulome

Im folgenden möchte ich eine kurze Übersicht über die Grösse, die Zellzusammensetzung und die Entwicklung einiger genauer untersuchten Granulome geben. Ziel dabei ist es, einen Einblick zu gewähren, jedoch kann ich in diesem Rahmen keine Vollständigkeit bieten.

***Leishmania donovani:***

Die Entwicklung und die Zusammensetzung der Granulome in mit *L. donovani* infizierten Balb/c-Mäusen wird von Gutierrez et al. (1984) beschrieben. Während der 1. Woche nach Infektion sind die Granulome in der Leber noch klein, zufällig übers Parenchym verteilt und nur schlecht vom umliegenden Gewebe abgrenzbar. Sie sind zusammengesetzt aus Lymphozyten und Makrophagen. In der Folge nimmt die Grösse zu und die einzelnen Granulome verschmelzen miteinander. Die Zellzusammensetzung ändert zu Gunsten von Epitheloidzellen, welche von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten umgeben sind. Nekrose von Hepatozyten und Riesenzellen fehlen. Nach 8-16 Wochen werden in etwa 80 % aller Granulome Epitheloidzellen gefunden. Da eine chronische Infektion bestehen bleibt (Murray, 1982), die Parasitenbürde demzufolge schwankend ist, werden nach 160 Tagen erneut in 57 % der Granulome nur Lymphozyten und Makrophagen gefunden. B-Zellen wurden in dieser Arbeit nicht beschrieben. Ihre Bedeutung in der Abwehr gegen *L. donovani* ist unklar. Mutante Mäuse, welche keine funktionellen B-Zellen haben, sind hochresistent gegen Infektionen mit *L. donovani*. Granulomatöse Läsionen in diesen Mäusen zeichnen sich durch eine erhöhte Anzahl neutrophiler Granulozyten aus. Diese scheinen die Funktion zu haben, eine frühe Parasitenbürde reduzieren zu können. Der Wirkmechanismus neutrophiler Granulozyten in diesem Zusammenhang ist unklar. Möglich sind eine direkte Abtötung des Parasiten oder eine allgemeine Induktion einer verstärkten Immunantwort über die Bildung und Ausschüttung von Zytokinen (Smelt et al., 2000).

***Schistosoma mansoni:***

Die Grösse und Zusammensetzung der Granulome ist abhängig von der Organlokalisation, dem Infektionsstadium und von der Immunabwehr des Wirtes (Weinstock und Boros, 1983). Beteiligte Zellen im Frühstadium sind hauptsächlich eosinophile Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und vereinzelt neutrophile Granulozyten (Elliott et al., 1990). Ferner werden in Läsionen auch Plasmazellen und Mastzellen beschrieben (Weinstock und Boros, 1983). Die Zellen lagern sich um eine zentrale Nekrose. In chronischen Granulomen findet man ausserdem Fremdkörperriesenzellen und eine Fibrose (Prata, 1982). In diesen späten Foci sind CD4<sup>+</sup>-T-Zellen erniedrigt und B-Zellen erhöht (Ragheb und Boros, 1989). Die Läsionen werden zunehmend kleiner, und die Anzahl Foci nimmt ebenfalls ab. Zusätzlich

wird eine erhöhte Anzahl CD8<sup>+</sup>-T-Zellen gefunden (Ragheb und Boros, 1989). Die Ausbildung der Läsionen ist abhängig von der Empfänglichkeit des Endwirtes. Die Maus gilt als toleranter Wirt, die Ratte als semitolerant (Auriault et al., 1996). Die Empfänglichkeit ist bei den einzelnen Inzucht-Mäusestämmen unterschiedlich. C57BL/6-Mäuse sind wenig, Balb/cJ-Mäuse hochempfindlich (Fanning et al., 1981).

### ***Mycobacterium tuberculosis/bovis:***

Bei immunkompetenten Mäusen sind Granulome bedingt durch *M. tuberculosis* wie folgt aufgebaut: Zentral infizierte Makrophagen sind von aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Riesenzellen und Epitheloidzellen umgeben (Roach et al., 1999). Bei C57BL/6- und 129-Wildtypmäusen sind zwei Wochen nach Infektion Läsionen in Leber, Lunge und Milz sichtbar (Jacobs et al., 2000).

Immunkompetente Mäusestämme unterscheiden sich in ihrer Empfänglichkeit für Mykobakterien. DBA-Mäuse sind empfänglicher als C57BL/6-Mäuse und Balb/c-Mäuse. DBA-Mäuse haben eine grössere Anzahl Läsionen mit vermehrt Makrophagen. Die Überlebensdauer beträgt bei empfänglichen Mäusen nur 150-180 Tage, was halb so lange ist wie bei resistenteren Stämmen (Medina und North, 1998).

Über die Abwehrfunktion von B-Zellen existieren unterschiedliche Meinungen. In B-zell-defizienten Mäusen führt eine Infektion mit einer hohen Bakterienzahl zu einer verminderten Granulombildung in der Lunge und zu einer verzögerten Bakteriämie, trotz gleichbleibender Bakterienbürde (Bosio et al., 2000). Andere Autoren finden hingegen eine erhöhte Bakterienmenge in der Frühphase der Infektion (Vordermeier et al., 1996). Die Wirkung der B-Zellen scheint nicht durch Antikörper, sondern durch sezernierte Zytokine zustande zu kommen (Bosio et al., 2000).

#### 4.2.4 *Encephalitozoon cuniculi* als Granulommodell?

##### **Mausmodell:**

*E. cuniculi* bewirkt in immunkompetenten Mäusen in der Regel keine symptomatische Infektion, dies im Gegensatz zu einer Infektion bei Immundefizienz (Schmidt und Shadduck, 1983). Ein Unterschied in der Empfänglichkeit verschiedener Stämme lässt sich aber nach intraperitonealer Infektion in bezug auf Anzahl Parasiten in der Peritonealflüssigkeit feststellen. Balb/c-Mäuse weisen eine tiefe Parasitenzahl auf. Im Gegensatz dazu haben C57BL/6- und 129/J-Mäuse eine hohe Anzahl Parasiten in der Peritonealflüssigkeit. Beide empfänglichen Mäusestämme zeigen symptomatisch Aszites (Niederkorn et al., 1981).

In Balb/c-Mäusen werden keine histopathologischen Läsionen gesehen (Hermanek et al., 1993). C57BL/6-Mäuse zeigen granulomatöse Veränderungen in Leber, ZNS, Niere und Lunge (Gannon, 1980), eine Parasitenvermehrung fehlt jedoch (Moretto et al., 2001). Solche Läsionen sind aber in C57BL/6-Mäusen nur vorübergehend charakterisierbar (eigene Beobachtungen). Aufgrund dieser Beobachtungen scheint sich die Maus nicht als Modelltier zum Studium von chronischen Erkrankungen mit *E. cuniculi* zu eignen.

##### **Rattenmodell:**

Natürliche Infektionen von wildlebenden Ratten wurden vereinzelt beschrieben, die Häufigkeit des Vorkommens ist jedoch unklar (Wilson, 1979). Infektionen von Laborratten traten in der Vergangenheit gehäuft auf (Lainson, 1954), diese werden jedoch durch gute hygienische Massnahmen gegenwärtig in den Labortierzuchten gut kontrolliert. Die Empfänglichkeit immunkompetenter Ratten scheint vergleichbar zu sein mit derjenigen von Mäusen. Im Unterschied zur Maus konnte bei einzelnen Rattenstämmen experimentell auch nach 160 Infektionstagen noch Läsionen in der Leber nachgewiesen werden (Müller-Doblies et al., 2002).

Als Vergleich verschiedener Immunantworten bieten sich zwei Rattenstämme mit unterschiedlicher Ausrichtung bezüglich CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort an. Brown Norway-Ratten tendieren zu einer CD4<sup>+</sup>-Th2-Immunantwort, wobei die Th2/Th1-Ratio im Blut 28 beträgt

(Groen et al., 1993). Diese Ausrichtung zu einer verstärkten Th2-Immunantwort bewirkt eine höhere Empfänglichkeit für eine durch Quecksilberchlorid induzierte Autoimmunität. Bezeichnend für diese autoimmune Reaktion sind eine polyklonale B-Zellaktivierung und eine vermehrte IgG-Produktion, im wesentlichen gesteuert über IL-4 (Gillespie et al., 1996). Die Th2/Th1-Ratio von Lewis-Ratten beträgt 0,9 (Groen et al., 1993). Dementsprechend reagieren Lewis Ratten verstärkt mit einer Th1-Immunantwort und mit einer erhöhten Empfänglichkeit für zelluläre Autoimmunität, wie sie beispielsweise bei experimenteller autoimmuner Encephalomyelitis (EAE) gegeben ist. Hauptsächlich sezernierte Zytokine sind IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  mit nachfolgender Makrophagenaktivierung und Aufregulation von iNOS (O'Brien et al., 1999).

Nebst der unterschiedlichen Tendenz bezüglich Th1- versus Th2-Immunantwort zeigen die zwei Rattenstämme jedoch auch ein abweichendes Verhältnis der CD4/CD8-T-Zellen. Lewis-Ratten haben verhältnismässig fast doppelt so viele CD8<sup>+</sup>-T-Zellen als Brown Norway-Ratten. Die CD4/CD8-Ratio lautet für Lewis 2.9 und für Brown Norway Ratten 5.7 (Groen et al., 1993).

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Tiere

Als Versuchstiere wurden weibliche, spezifisch pathogenfreie Brown Norway-Ratten und Lewis-Ratten verwendet. Alle Tiere waren 5 Wochen alt und wurden von RCC Ltd (Füllinsdorf, Schweiz) bezogen. Es wurden jeweils 2-4 Ratten gemeinsam in einem Makrolon Typ 5 Mikroisolator eingestallt. Die Tiere bekamen pelletiertes Rattenfutter und Wasser zur freien Verfügung. Alle Tiere jeder Rasse wurden in 3 Gruppen eingeteilt: uninfizierte Kontrolltiere (LEW: n=9; BN: n=9), Ratten inokuliert mit der niedrigen *E. cuniculi*-Infektionsdosis (LEW: n=11; BN: n=10), Ratten inokuliert mit der hohen *E. cuniculi*-Infektionsdosis (LEW: n=12; BN: n=14). Die experimentellen Infektionen erfolgten peroral. Das *E. cuniculi*-Isolat (IPZ:CH-Rat5117) stammte aus einer wildlebenden Wanderratte (*Rattus norvegicus*), welche in der Stadt Zürich gefangen wurde (Müller-Doblies et al., 2002). Die hohe Infektionsdosis betrug 80 000 *E. cuniculi*-fokusbildende Einheit (Ecffu) (Pye und Cox, 1979) und die niedrige Infektionsdosis 80 Ecffu. Die Tiere wurden durch CO<sub>2</sub>-Betäubung und Entbluten getötet.

**Tabelle 4:** In zwei Versuchen eingesetzte Ratten: Versuch 2000 und 2001 (in Klammer)

Infektionsgruppe	Initialer Tötungszeitpunkt 10 Tage p.i.	Früher Tötungszeitpunkt 25 Tage p.i	Mittlerer Tötungszeitpunkt 70 Tage p.i	Später Tötungszeitpunkt 150 Tage p.i
Brown Norway ( 80 000 Ecffu)	0 (2) = 2	2 (2) = 4	2 (0) = 2	3 (3) = 6
Brown Norway (80 Ecffu)	0 (2) = 2	2 (2) = 4	2 (0) = 2	2 (0) = 2
Lewis (80 000 Ecffu)	0 (2) = 2	2 (2) = 4	2 (0) = 2	3 (1) = 4
Lewis (80 Ecffu)	0 (3) = 3	2 (1) = 3	2 (0) = 2	2 (1) = 3
Brown Norway Kontrolltiere	0 (2) = 2	0 (2) = 2		2 (3) = 5
Lewis Kontrolltiere	0 (2) = 2	0 (2) = 2		2 (3) = 5

## **5.2 Gewebepvorbereitung und histologische Untersuchung**

Aus den Ratten wurden steril Proben von Leber, Lunge, Gehirn, Herz, Niere, Nebenniere, Speicheldrüse, Lymphknoten, Thymus, Magen, Dünndarm, Dickdarm (Caecum und Colon) und Milz entnommen.

Die Organproben wurden 24 Stunden in 4 % gepuffertem Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Stücke von jeweils 5 µm Dicke wurden geschnitten und auf Superfrost Objektträger™ aufgezogen. Es wurde darauf geachtet, dass jeweils bei allen Tieren aus derselben Organlokalisationen Gewebeproben geschnitten wurden.

Jeweils einer der Objektträger wurde mit Hämatoxylin und Eosin nach Standardmethode gefärbt und mittels Lichtmikroskopie analysiert.

## **5.3 Immunhistochemische Auswertung**

### **5.3.1 Monoklonale und polyklonale Antikörper**

Für die Markierung von B-Zellen wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper gegen Ratten CD45R (Klon: HIS24) von Pharmingen (San Diego, CA, USA) verwendet. Er wurde in einer Verdünnung von 1:100 angewendet. Der monoklonale Maus-Antikörper gegen ED1 (Klon: ED1) der Ratte reagiert mit lysosomalen Membranen praktisch aller Gewebemakrophagen (Damoiseaux et al., 1994) und wurde von Serotec Ltd. (Oxford, England) bezogen. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:250 angewendet. Zur Detektion von T-Zellen wurde ein polyklonales Kaninchenserum gegen humanes CD3 angewendet. Dieses kreuzreagiert mit dem Ratten-CD3 und wurde von DAKO Diagnostika GmbH (Glostrup, Dänemark) bezogen. Dieses kam 1:500 verdünnt zur Anwendung.

### 5.3.2 Inkubationsprotokoll für Paraffinschnitte

Normale Paraffinschnitte (5 µm) wurden immunhistochemisch auf B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen in Leber- und Lungenläsionen untersucht.

1. Entparaffinieren der Schnitte in Xylol zweimal für jeweils 3 Minuten. Rehydrierung in der absteigenden Alkoholreihe (jeweils 30 Sekunden zweimal in 100 % Ethanol, zweimal 96 % Ethanol, zweimal 70 % Ethanol), dann Wässerung in Aqua dest.
2. Gegenfärbung mit Hämalan (2 Minuten, respektive 3 Minuten für Inkubationen über Nacht), dann 3 Minuten Abspülen in kaltem Wasser zur Bläuung.
3. Nur für CD3-Nachweis: Vorbehandlung der Schnitte mit 0.1 % Pronase (Protease Typ XXVIII, Sigma P4789) in Tris-HCL-Buffer bei 37° Celsius für 5 Minuten.
4. Überbringen der Schnitte in Coverplates (Shandon TM, No. 7211013). Einspannen in die Coverplate Kassette (Shandon TM, No 7331017) und Spülen mit PBS.
5. Inaktivierung der endogenen Peroxidase 10 Minuten mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O + 0.2 % NaN<sub>3</sub> (100 µl pro Schnitt, bzw. 2 Tropfen) bei Raumtemperatur, danach spülen mit PBS.
6. Blockieren von endogenem Biotin mit einem Avidin-Biotin Blocking-Kit (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA 94010, USA): 20 Minuten Reagenz 1 ( 2 Tropfen Avidin D), spülen mit PBS, dann 20 Minuten Inkubation mit Reagenz 2 (2 Tropfen Biotin), spülen mit PBS jeweils bei Raumtemperatur.
7. Proteinblockierung mit 100 µl Protein Block Serum-free (DAKO Diagnostics, Glostrup, Denmark; Code No X0909) für 10 Minuten bei Raumtemperatur.
8. Inkubation mit 100 µl primären Antikörper CD45R oder ED1 jeweils 1 Stunde bei 37° C, bzw. CD3 über Nacht bei Raumtemperatur im angefeuchteten Coverslip-System, dann spülen mit PBS.



9. Detektion mittels ChemMate-Kit (DAKO Diagnostics, Glostrup, Denmark).

9.1 Inkubation der Schnitte mit 100 µl ChemMate Link-Antikörper 15 Minuten bei Raumtemperatur, für die Detektion von CD3 wurde dem Reagenz 3 % normales Rattenserum beigemischt, spülen mit PBS.

9.2 Inkubation der Schnitte mit 100 µl ChemMate Peroxidase-konjugiertem Streptavidin (HRP) für 15 Minuten bei Raumtemperatur, spülen mit PBS.

9.3 Entnehmen der Schnitte aus dem Coverplate-System, Absaugen des PBS.

9.4 100 µl Substrat/Chromogen-Mischung (Substratekit AEC/red) auftragen (Zymed Laboratories Inc., CA 94080, USA), 5-20 Minuten inkubieren lassen in der Feuchtkammer bis zu einer deutlichen Rotfärbung (Kontrolle unter dem Mikroskop).

9.5 Spülen mit PBS.

10. Eindecken der Schnitte mit Gelatine (Kaisers Glyteringelatine, Merck, Darmstadt, Deutschland).

## 5.4 Statistische Auswertungen

Die Schnitte wurden mit einem Flachbettscanner eingescannt und mittels einem Gelreading-Programm (Chemilumineszenz) vermessen. Als Einheit wird Anzahl Läsionen/cm<sup>2</sup> Gewebe x 100 verwendet bzw. Anzahl B-Zellen/mm<sup>2</sup> Gewebe x 100.

Für die Bestimmung der Anzahl ED1<sup>+</sup>-Zellen in den Lebern-Schnitten wurden im Minimum 80 Makrophagen gezählt, durch die Anzahl Hepatozyten in den gleichen Gesichtsfeldern geteilt und als Makrophagen/Hepatozyten-Verhältnis angegeben.

Die gesammelten Daten wurden mittels Varianz-Analyse und t-test ausgewertet. Als Signifikanzniveau wurde p<0.05 festgelegt.

## 5.5 Anhang: Chemikalien, Lösungen und Puffer

PBS	(= Phosphate buffered saline) 8,00 g NaCl; 0,20 g KCl; 0,24 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1,44 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; as 1000 ml mit Aqua destillata, pH 7,4 einstellen mit 1 M NaOH
$\text{H}_2\text{O}_2$ -Block	20,0 mg Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ ) 0,2 %; 9,0 ml Aqua destillata; 1,0 ml $\text{H}_2\text{O}_2$ 30 %
0,05 M Tris-Puffer, pH 7,6	60,57 g Tris (hydroxymethyl)-aminomethane ; 25 ml HCL konz. 1000 ml Aqua destillata, pH einstellen mit 1 M HCL; 1:10 mit Aqua destillata verdünnen
Pronase	0,1 % Pronase (Protease Type XXVIII, Sigma P 4789) in 0,05 M Tris-Puffer

## 6. Resultate

### 6.1 Histologie

#### 6.1.1 Organlokalisation der durch *E. cuniculi* bedingten Läsionen

Von mit *E. cuniculi* infizierten Ratten, wie auch von nicht infizierten Kontrolltieren, wurden Leber, Lunge, Milz, Magen, Dünndarm, Dickdarm, Blase, Niere, Nebennieren, Mesenteriallymphknoten, Thymus, Herz, Glandula mandibularis und das Gehirn auf das Vorkommen von Läsionen untersucht. Alle Organe ausser Leber und Lunge waren frei von Läsionen. Die Leber- und Lungenläsionen werden im weiteren genauer untersucht. Die Beschreibung der Leberläsionen ist in Tabelle 5 und 6 zusammengefasst.

#### 6.1.2 Histologische Charakterisierung der Leberläsionen

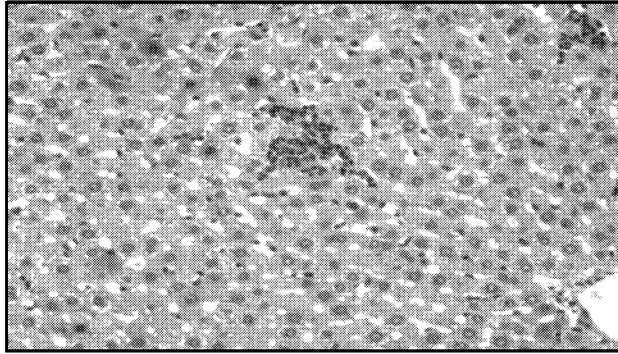
Ansammlungen von Entzündungszellen im Leberparenchym in den HE gefärbten Schnitten, lassen sich durch ihre Zellzusammensetzung und die Abgrenzbarkeit zum umliegenden Gewebe wie folgend gruppieren. Pro Tier wurde jeweils ein Leberschnitt ausgezählt. Die ausgezählte Fläche von gesamthaft 44 Tieren betrug durchschnittlich 102,5 mm<sup>2</sup>.

**Läsion 1:** Die Läsion 1 ist eine ungeordnete Ansammlung von mehrheitlich Lymphozyten, einzelnen Makrophagen und selten Plasmazellen (Abb. 2.1).

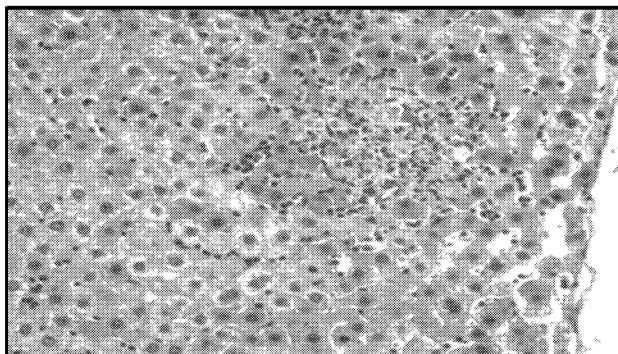
**Läsion 2:** Als Läsion 2 wurden Entzündungsherde klassifiziert, welche sich zu einem Gebilde aus hauptsächlich Makrophagen, durchmischt mit einzelnen Lymphozyten und vereinzelt Plasmazellen formierten. Die Läsion ist nicht vom umliegenden Lebergewebe abgegrenzt und enthält degenerierte Hepatozyten mit verstärkt eosinophilem Zytoplasma und gelegentlich pyknotischen Kernen (Abb. 2.2).

**Läsion 3:** Die Läsion 3 ist eine Mischung verschiedener Zellen der monozytären Linie, hauptsächlich Makrophagen und Epitheloidzellen, seltener Riesenzellen. Diese granulomatöse Herde sind klar vom Lebergewebe abgegrenzt und von einem Lymphozytensaum umgeben (Abb. 2.3).

2.1



2.2



2.3

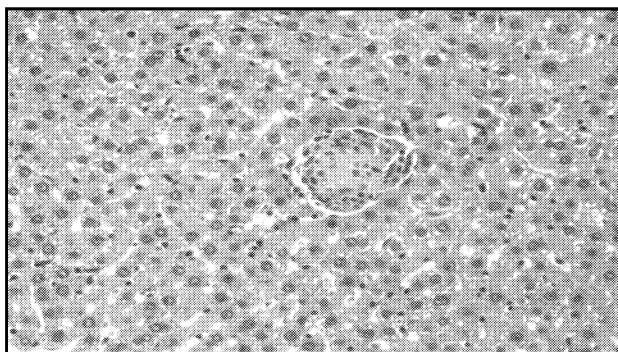


Abb. 2 Granulomatöse Läsion vom Typ 1 (2.1), Typ 2 (2.2) und Typ 3 (2.3) in der Leber einer Brown Norway-Ratte inokuliert mit 80 000 *E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten nach 150 Infektionstagen (HE)

### 6.1.3 Leberläsionen von Lewis-Ratten nach *E. cuniculi*-Infektion

#### **Lewis-Ratten mit niedriger Infektionsdosis:**

Bei tiefer Infektionsdosis, das heisst mit 80 *E. cuniculi*-fokus-bildenden Einheiten (Ecffu) inokulierten Tieren, war ein deutlicher Anstieg der Anzahl Läsionen zwischen dem ersten Tötungszeitpunkt nach 10 Infektionstagen und dem zweiten Euthanasiezeitpunkt feststellbar (Abb. 3A). Bei drei untersuchten Ratten stieg die Anzahl Läsionen auf 26,7 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe am 25. Infektionstag (Tab. 5A). Zu diesem Zeitpunkt konnten 50 % der Läsionen dem Typ 1, 28 % dem Typ 2 und 12 % den chronischen Granulomen vom Typ 3 zugeordnet werden (Tab. 6). Der Hauptteil aller Foci war aus 10-50 Zellen zusammengesetzt. Vereinzelt bestanden die Läsionen aus mehr als 50 Zellen.

Im Verlaufe der Infektion nahm die Anzahl an Leberveränderungen ab (Abb. 3A). Nach 150 Infektionstagen waren bei den drei untersuchten Ratten noch 10,6 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe nachzuweisen, wovon 88 % dem Typ 1 entsprachen. Zu dem Zeitpunkt waren keine organisierten Granulome (Typ 3) mehr vorhanden (Abb. 4) und die Läsionen setzten sich aus weniger als 20 Zellen, hauptsächlich Lymphozyten und vereinzelt Makrophagen zusammen.

#### **Lewis-Ratten mit hoher Infektionsdosis:**

Bei zwei mit 80 000 Ecffu inokulierten Lewis-Ratten wurde bereits nach zehntägiger Infektion eine vergleichbare Anzahl Läsionen in der Leber gefunden wie nach 25 Infektionstagen (Abb. 3A). Zu diesem Termin erreichte die Läsionendichte bei vier untersuchten Ratten 32,4 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe (Tab. 5A). Anteilsmässig wurden 52 % Läsionen vom Typ 1, 29 % vom Typ 2 und 11 % vom Typ 3 gezählt (Tab. 6). Kleinere, mittlere und grosse Foci mit mehr als 50 Zellen waren in gleicher Menge vorhanden. Einzelne Veränderungen waren aus mehr als 100 Zellen zusammengesetzt.

Mit zunehmender Infektionsdauer nahm sowohl die Grösse wie auch die Anzahl der Läsionen ab. Nach 150 Infektionstagen wurden bei vier getöteten Ratten noch durchschnittlich 15,2 Läsionen/cm<sup>2</sup> Leber gefunden. Mehr als die Hälfte dieser Läsionen enthielt weniger als 20 Entzündungszellen. Foci mit mehr als 100 Zellen waren keine mehr vorhanden. Der

prozentuale Anteil der einzelnen Läsionstypen war vergleichbar mit der frühen Infektionsphase.

#### **Lewis-Kontrolltiere:**

Zwei nicht infizierte Lewis-Ratten wurden zum Zeitpunkt 25 Tage p.i. der übrigen Gruppen getötet. Bei der Auswertung des Leberschnittes wurden 4,1 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe gefunden (Tab. 5A). Bei den fünf Kontrolltieren, die zum Zeitpunkt 150 Tage p.i. der anderen Gruppen untersucht wurden, waren 3,6 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe vorhanden. Nicht infizierte Kontrolltiere hatten ausschliesslich Läsionen vom Typ 1, welche aus maximal 10-20 Lymphozyten zusammengesetzt waren.

#### **6.1.4 Leberläsionen von Brown Norway-Ratten nach *E. cuniculi*-Infektion**

##### **Brown Norway-Ratten mit niedriger Infektionsdosis:**

Bei dieser Infektionsgruppe (80 Ecffu) waren am 10. Infektionstag in der untersuchten Schnittebene nur wenige Leberläsionen sichtbar (Abb. 3B). Daraufhin stieg die Anzahl Läsionen an, so dass am 25. Infektionstag bei vier untersuchten Ratten 29,6 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe gefunden wurden (Tab.5B). Kleine, mittlere und grosse Foci waren in gleicher Menge über den Leberschnitt verteilt. Proportional liessen sich 53 % aller Läsionen dem Typ 1, 30 % dem Typ 2 und 4 % dem Typ 3 zuordnen (Tab. 6). In Folge nahm die Anzahl an Foci mit zunehmender Infektionsdauer ab (Abb. 3B).

In der späten Infektionsphase, nach 150 Infektionstagen, zählte ich bei zwei getöteten Ratten noch 15,4 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe. Die Mehrheit der Läsionen enthielt weniger als 20 Zellen. Es gab keine Foci mit mehr als 50 Zellen. Der Anteil an Läsionen vom Typ 1 betrug 82,6-100. Chronische Granulome vom Typ 3 waren keine mehr nachweisbar (Abb. 4).

### **Brown Norway-Ratten mit hoher Infektionsdosis:**

Brown Norway-Ratten inokuliert mit der hohen Infektionsdosis (80 000 Ecffu) reagierten früh mit einer entzündlichen Reaktion im Lebergewebe (Abb. 3B). Bereits bei den ersten histologischen Untersuchungen zweier Ratten nach 10 Tagen p.i. waren 37,7 Läsionen/cm<sup>2</sup> Leber zählbar (Tab. 5B). Am 25. Infektionstag wurden durchschnittlich bei vier untersuchten Ratten 55,4 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe gefunden. In dieser frühen Infektionsphase liessen sich 51 % aller Veränderungen dem Typ 1 und 26 % dem Typ 2 zuordnen. Organisierte Granulome vom chronischen Typ 3 liessen sich 13 % nachweisen (Tab. 6). Die Hälfte der Foci setzten sich aus weniger als 20 Zellen zusammen. Nahezu 1/10 aller Läsionen jedoch enthielten mehr als 100 Zellen.

Die Anzahl Läsionen stieg nach einer kurzzeitigen Abnahme auf 64,8 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe und war nach 150 Infektionstagen bei sechs untersuchten Brown Norway Ratten signifikant höher ( $p > 0,01$ ) als bei mit gleicher Infektionsdosis inokulierten Lewis Ratten. Der Anteil an Typ 3-Läsionen nahm über die Dauer im Mittel zu und beträgt 23 %. Ebenfalls waren im Unterschied zur Frühphase vermehrt Läsionen mit mehr als 50 Zellen zählbar. Kleinere Foci mit weniger als 20 Zellen wurden dafür seltener gefunden.

### **Brown Norway-Kontrolltiere:**

Bei zwei Kontrolltiere waren zum Zeitpunkt von 25 Tagen nach Inokulierung der Infektionsgruppen 4,1 Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe zählbar (Tab. 5B). Nebst rein lymphozytären Veränderungen vom Typ 1 waren auch einige Foci mit einer deutlichen Menge an Makrophagen und einzelnen Lymphzyten entsprechend dem Typ 2 vorhanden (Tab. 6). Zum Zeitpunkt 150 Tage p.i. der infizierten Ratten waren bei fünf Kontrolltieren 10,2 Läsionen/cm<sup>2</sup> zu finden. Keine der Läsion hatte mehr als 20 Zellen.

**Tabelle 5A:** Anzahl (Mittelwert und Standardfehler, SEM) und Grösse von Läsionen in der Leber von experimentell mit *E. cuniculi*-Sporen infizierten Lewis-Ratten. Niedrige und hohe Infektionsdosis angegeben in *E. cuniculi*-fokusbildenden Einheiten (Ecffu).

<b>Inzuchtstamm Infektionsdosis</b>	<b>Anzahl Tiere (n)</b>	<b>Tage p.i.</b>	<b>Granulomzahl Läsion/cm<sup>2</sup> Lebergewebe (SEM)</b>	<b>Zellzahl/Läsion</b> Klein= < 20 Zellen Mittel = bis 50 Zellen Gross = 50-100 Zellen Ganz gross = > 100 Zellen
<b>Lewis Ratten 80 Ecffu</b>	3	10	1,7 (0 – 3,3)	kleine
	3	25	26,7 (1,39)	kleine, mittlere
	2	70	16,9 (8,1 – 25,7)	kleine
	3	150	10,6 (3,91)	kleine
<b>Lewis Ratten 80 000 Ecffu</b>	2	10	12,2 (15,8 – 29,2)	kleine, mittlere, grosse
	4	25	32,4 (4,0)	kleine, mittlere, grosse, vereinzelt ganz grosse
	2	70	10,1 (8,3 – 11,9)	kleine
	4	150	15,2 (1,54)	kleine, mittlere
<b>Lewis Ratten Kontrolltiere</b>	2	10	3,3 (0 – 6,6)	kleine
	2	25	4,1 (3,1 – 5,0)	kleine
	5	150	3,6 (0,67)	kleine



**Tabelle 5B:** Anzahl (Mittelwert und Standardfehler, SEM) und Grösse von Läsionen in der Leber von experimentell mit *E. cuniuli*-Sporen infizierten Brown Norway-Ratten. Niedrige und hohe Infektionsdosis angegeben in *E. cuniculi*-fokusbildenden Einheiten (Ecffu).

<b>Inzuchtstamm Infektionsdosis</b>	<b>Anzahl Tiere (n)</b>	<b>Tage p.i.</b>	<b>Granulomzahl Läsionen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe (SEM)</b>	<b>Zellzahl/Läsion</b> Klein = < 20 Zellen Mittel = bis 50 Zellen Gross = 50 – 100 Zellen Ganz gross = > 100 Zellen
<b>Brown Norway 80 Ecffu</b>	2	10	6,1 (4,3 - 7,9)	kleine
	4	25	29,6 (2,96)	kleine, mittlere, grosse
	2	70	13,7 (10,6 – 16,7)	Kleine, mittlere
	2	150	15,4 (12,3 – 18,4)	kleine
<b>Brown Norway 80 000 Ecffu</b>	2	10	37,7 (33,1 – 42,2)	kleine, mittlere, grosse, vereinzelt ganz grosse
	4	25	55,4 (5,0)	kleine, mittlere, grosse, vereinzelt ganz grosse
	2	70	46,2 (36,4 – 56,0)	Kleine, mittlere, grosse, ganz grosse
	6	150	64,8 (5,4)	kleine, mittlere, grosse, vereinzelt ganz grosse
<b>Brown Norway Kontrolltiere</b>	2	10	1,5 (0 – 2,9)	kleine
	2	25	4,1 (2,7 – 5,5)	kleine
	5	150	10,0 (2,08)	kleine

**Tabelle 6:** Mittelwerte und Standardfehler (SEM) der prozentualen Verteilung der drei Läsionstypen (vergleiche Kapitel 4.1.2) in der Leber von experimentell mit *E. cuniculi*-Sporen infizierten Inzuchtratten (BN und LEW). Niedrige und hohe Infektionsdosis angegeben in *E. cuniculi*-fokusbildenden Einheiten (Ecffu).

Inzuchtstamm Infektionsdosis	Anzahl Tiere (n)	Tage p.i.	Läsionstyp 1 (%) (SEM)	Läsionstyp 2 (%) (SEM)	Läsionstyp 3(%) (SEM)
<b>Lewis 80 Ecffu</b>	3	25	50,0 (5,7)	28,0 (2,0)	12,0 (6,3)
	3	150	88,0 (6,6)	12,0 (6,6)	0 (0)
<b>Lewis 80 000 Ecffu</b>	4	25	52,0 (1,8)	29,0 (2,3)	11,0 (2,2)
	4	150	58,0 (2,2)	23,0 (5,0)	7,0 (1,3)
<b>Lewis Kontrolltiere</b>	2	25	100	0	0
	5	150	100 (0)	0 (0)	0 (0)
<b>Brown Norway 80 Ecffu</b>	4	25	53,0 (3,6)	30,0 (4,8)	4,0 (1,6)
	2	150	91,3 (82,6 – 100)	3,0 (0 – 5,9)	0
<b>Brown Norway 80 000 Ecffu</b>	4	25	51,0 (6,4)	26,0 (6,4)	13,0 (2,1)
	6	150	43,0 (5,1)	27,0 (2,1)	23,0 (3,9)
<b>Brown Norway Kontrolltiere</b>	2	25	73,3 (66,6 – 80,0)	26,7 (20,0 – 33,3)	0
	5	150	88,0 (8,3)	5,0 (3,0)	0 (0)

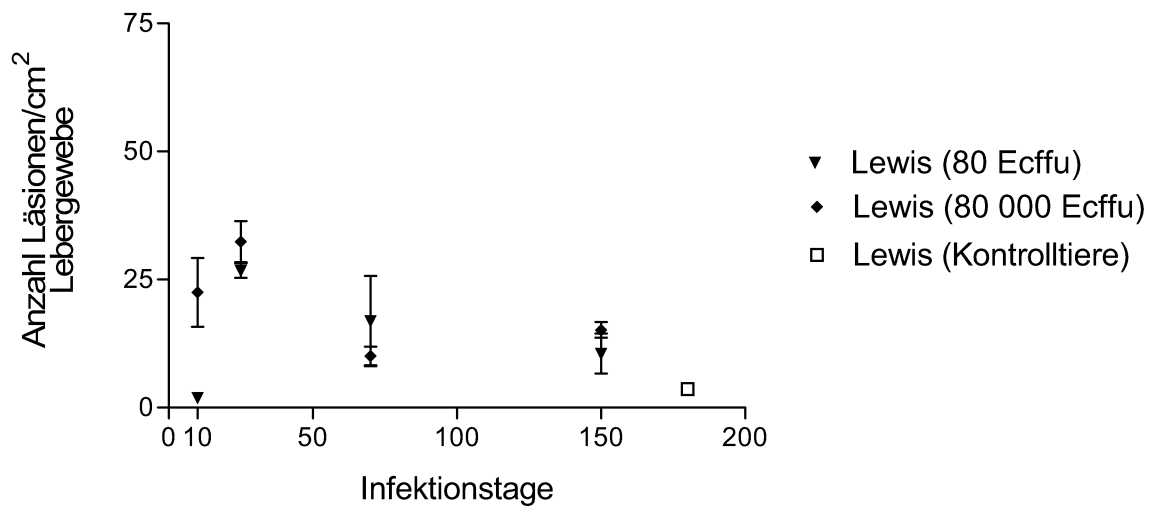


Abb. 3a Anzahl Läsionen (Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler, SEM) in der Leber von 2 Gruppen infizierter Lewis-Ratten (n=19) beziehungsweise Negativkontrollen (n=9); 10, 25, 70 und 150 Tage nach experimenteller Infektion mit *E. cuniculi*-Sporen. Infektionsdosis angegeben in *E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten (Ecffu = 80 oder 80 000).

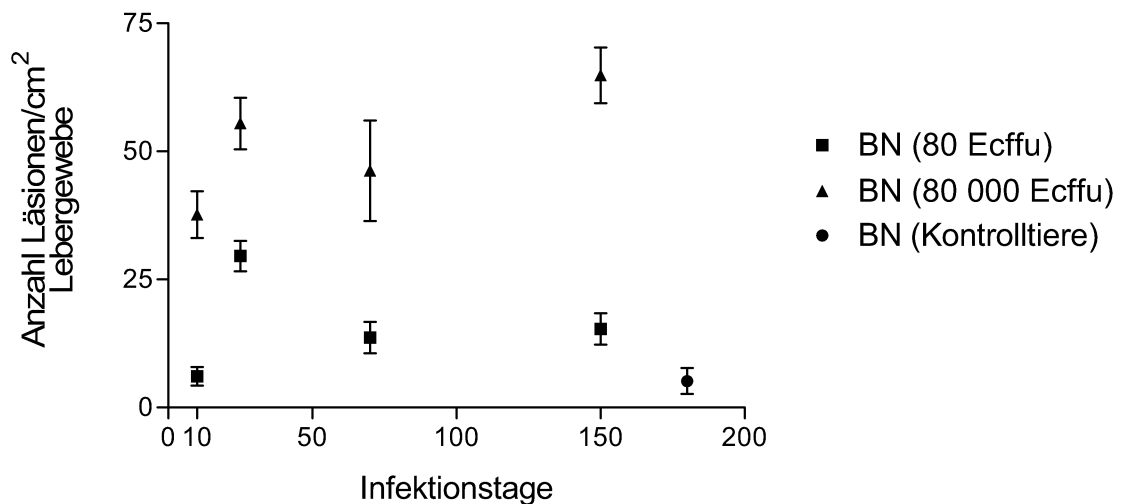


Abb. 3b Anzahl Läsionen (Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler, SEM) in der Leber von 2 Gruppen infizierter Brown Norway-Ratten (n=20) beziehungsweise Negativkontrollen (n=9); 10, 25, 70 und 150 Tage nach experimenteller Infektion mit *E. cuniculi*-Sporen. Infektionsdosis angegeben in *E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten (Ecffu = 80 oder 80 000).

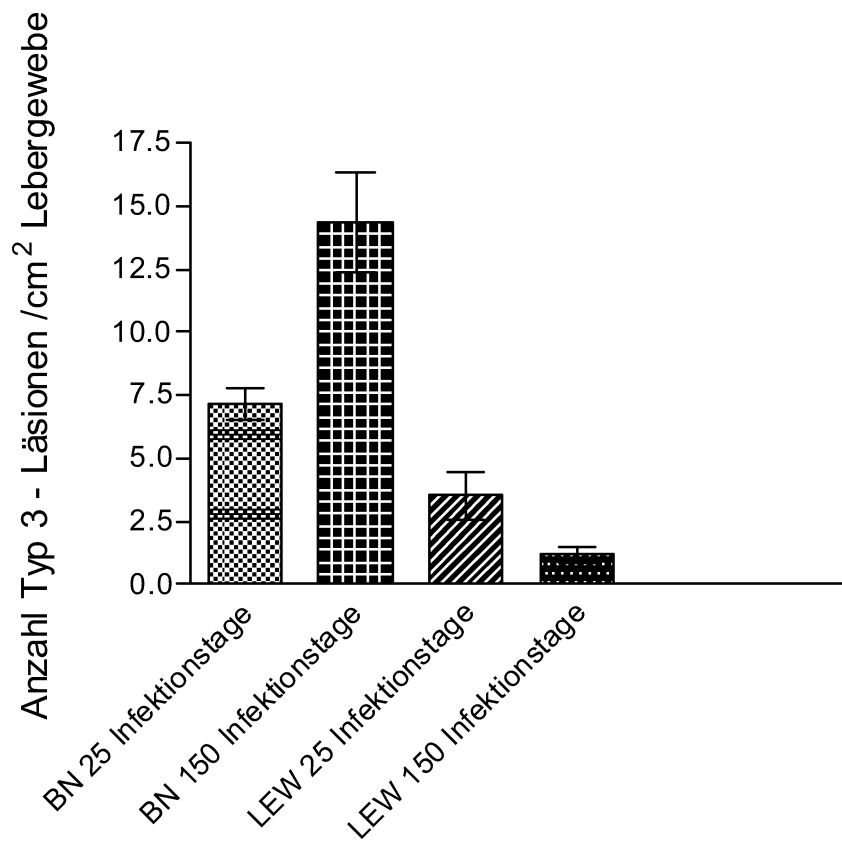


Abb. 4 Anzahl Läsionen (Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler, SEM) vom Typ 3-Läsionen in der Leber von 2 Gruppen infizierter Ratten (BN = 8, LEW = 7); 25 und 150 Tage nach experimenteller Infektion mit *E. cuniculi*-Sporen. . Infektionsdosis angegeben in *E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten (Ecffu = 80 000).

### 6.1.5 Histologische Charakterisierung der Lungenläsionen

Lungenläsionen wurden nur in der frühen Infektionsphase, das heisst zwischen 10 und 30 Tage p.i., gesehen. Bei einer von sechs mit der niedrigen Infektionsdosis (80 Ecffu) inokulierten Lewis-Ratten war in der untersuchten Schnittebene eine kleine Läsion mit hauptsächlich Lymphozyten und vereinzelt Makrophagen sichtbar. Bei fünf von sechs Lewis-Ratten, die mit der hohen Infektionsdosis infiziert wurden, waren 1-3 kleinere, entzündliche Läsionen pro Schnittebene mit vorwiegend Lymphozyten und einigen Makrophagen, seltener neutrophilen Granulozyten, nachweisbar.

Von sechs Brown Norway-Ratten, welche mit der niedrigen Dosis (80 Ecffu) inokuliert wurden, zeigten fünf Tiere eine mässige bis starke entzündliche Reaktion im Lungengewebe. Die Zellzusammensetzung war vergleichbar mit derjenigen in den Lungenläsionen der Lewis-Ratten. Alle sechs Brown Norway-Ratten, die mit hoher Infektionsdosis infiziert waren, hatten grosse bis sehr grosse Foci in der Lunge 25 Tage p.i. (Abb. 5). Die Herde waren über die gesamte Schnittebene verteilt. Meistens lagen 2-3 Foci nahe beieinander. Die Läsionen setzten sich hauptsächlich aus Makrophagen und Lymphozyten zusammen. Gehäuft sah man auch Epitheloidzellen und Riesenzellen. In einzelnen Foci waren zudem deutliche Mengen neutrophiler Granulozyten vorhanden. Zwei uninfizierte Kontrolltiere (Brown Norway) zeigten mittelgrosse, granulomatöse Herde mit hauptsächlich Makrophagen und Lymphozyten, dazwischen vereinzelt neutrophile Granulozyten und nicht selten Riesenzellen. Nach 90 Infektionstagen konnte bei den mit der hohen Infektionsdosis inokulierten Brown Norway-Ratten fokal im gesamten Lungenparenchym vereinzelt noch vermehrt Lymphozyten und Makrophagen im Vergleich zu den Negativkontrollen festgestellt werden. Granulomatöse Läsionen waren keine mehr vorhanden.

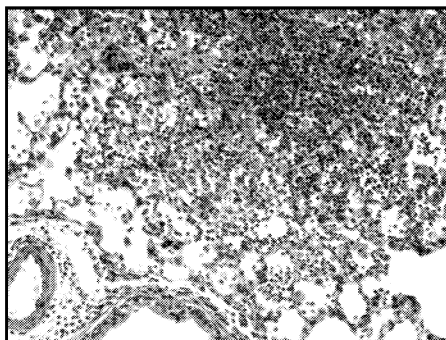


Abb. 5 Granulomatöse Läsion in der Lunge einer Brown Norway Ratte inokuliert mit 80 000 *E. cuniculi*-Fokusbildende Einheiten nach 25 Infektionstagen (HE)

## 6.2 Immunhistologie

### 6.2.1 Verteilung von B-Zellen, Makrophagen und T-Zellen in *E. cuniculi* bedingten Leberläsionen

Die im Hämatoxilin-Eosin gefärbten Schnitt differenzierten Läsionen (vgl. Kapitel 4.1.2) wurden getrennt voneinander auf das Vorkommen von B-Zellen, T-Zellen und Makrophagen untersucht. Dafür wurde jeweils dieselbe Läsion in Serienschnitten mit einem Marker für B-Zellen (CD45R), für Makrophagen (ED1) und T-Zellen (CD3) gefärbt. Der prozentuale Anteil der untersuchten Entzündungszellen ist in Tabelle 7 zusammengefasst.

#### Granulomatöse Läsionen in Lewis-Ratten nach 25 Infektionstagen

Nach 25 Infektionstagen bestanden die hauptsächlich lymphozytären Läsionen (Typ 1) aus einem überwiegenden Anteil an CD3<sup>+</sup>-Zellen (45,4 %) und CD45R<sup>+</sup>-Zellen (14,8 %). Mit dem ED1-Marker färbten sich 33,5 % aller Zellen.

Läsionen vom Typ 2 und Typ 3 bestanden überwiegend aus ED1<sup>+</sup>-Zellen (Tab. 7). Läsionen vom Typ 3 enthielten 55 % ED1<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 6), Läsionen vom Typ 2 jedoch nur 33,6 %. In Letztgenannten waren 19 % aller Zellen CD45R<sup>+</sup> und 25 % der gefärbten Zellen CD3<sup>+</sup>.

Der Anteil an CD45R<sup>+</sup>-Zellen war in Läsionen vom Typ 3 deutlich niedriger (7,6 %), als in Läsionen vom Typ 2 (19 %). CD3<sup>+</sup>-Zellen waren in vergleichbarer Menge vorhanden.

#### Granulomatöse Läsionen in Lewis-Ratten nach 150 Infektionstagen

Nach 150 Infektionstagen war in den Leberläsionen der Lewis-Ratten prozentual der grösste Anteil aller gefärbten Zellen CD3<sup>+</sup> (Abb. 6 und Tab. 7), wobei die Menge höher war in Läsionen vom Typ 1 (52 %) als in Läsionen vom Typ 2 (42,3 %) beziehungsweise vom Typ 3 (38,6 %). Der Anteil an ED1<sup>+</sup>-Zellen lag bei allen Läsionen zwischen 9,1 % und 17,5 %. Nur ein kleiner Teil des Zytoplasmas der Makrophagen wurde jeweils angefärbt (Abb. 6).

CD45R<sup>+</sup>-Zellen waren in einem Prozentsatz von 10 % in allen Läsionentypen vorhanden.

Ein deutlicher Anteil der Zellen, das heisst 30-37 % aller Zellen, liessen sich mit keinem dieser drei Marker färben.

### **Granulomatöse Läsionen in Brown Norway-Ratten nach 25 Infektionstagen**

Läsionen vom Typ 1 bestanden 25 Tage p.i. hauptsächlich zu 59 % aus CD3<sup>+</sup>-T-Zellen ED1<sup>+</sup> waren 23 % aller Zellen. Weiter färbten sich 8 % der Zellen in den Läsionen mit dem Marker für B-Zellen an.

In Typ 2- und Typ 3-Läsionen war der Hauptteil der Zellen ED1<sup>+</sup> (37,8 % bzw. 64,8 %). CD3<sup>+</sup> waren 23,8 % der Zellen in Typ 2-Läsionen, respektive 32,5 % aller Zellen in Läsionen des Typ 3. Die Anzahl CD45R<sup>+</sup>-Zellen betrug 1,5 % in Typ 3-Läsionen und 10,5 % in Läsionen vom Typ 2.

### **Granulomatöse Läsionen in Brown Norway-Ratten nach 150 Infektionstagen**

Nach 150 Infektionstagen bestanden Läsionen vom Typ 1 zum grössten Teil aus CD3<sup>+</sup>-Zellen. Der Anteil an ED1<sup>+</sup>-Zellen betrug 18,4 %. CD45R<sup>+</sup> waren 8,4 % aller Zellen (Tab. 7). Die Läsionen vom Typ 2 hatten gleiche Anteilen an CD3<sup>+</sup>-Zellen (29,4 %) und ED1<sup>+</sup>-Zellen (33,2 %). Mit dem Marker für B-Zellen färbten sich 5,8 % aller Zellen. In den Läsionen vom Typ 3 waren ED1<sup>+</sup>-Zellen mit einem Prozentsatz von 55,8 % vorherrschend. CD3<sup>+</sup> waren 17,6 % aller Zellen und 3,4 % der Zellen liessen sich mit dem B-Zellmarker färben. ED1<sup>+</sup> gefärbte Zellen waren sehr prominent, praktisch das gesamte Zytoplasma der Zelle wurde angefärbt (Abb. 7). Der Anteil ED1<sup>+</sup>-Zellen in den Läsionen vom Typ 3 war signifikant höher als derjenige in Läsionen vom Typ 3 von Lewis-Ratten nach 150 Infektionstagen (Abb. 6 und Tab. 7).

**Tabelle 7:** Prozentualer Anteil an CD45R<sup>+</sup>-, ED1<sup>+</sup>- und CD3<sup>+</sup>- Zellen in drei verschiedenen Typen von Läsionen (vergleiche dazu Kapitel 4.1.2) in der Leber experimentell mit *E. cuniculi*-Sporen infizierter Inzuchtratten (Brown Norway und Lewis)(Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler,SEM).

Läsionen	Inzuchtstamm (n)	Anzahl ausgewertete Läsionen	Tage p.i.	CD45R (%) (SEM)	ED1 (%) (SEM)	CD3 (%) (SEM)	Nicht klassifiziert (%) (SEM)
<b>Typ 1</b>	LEW (3)	5	25	14,8 (1,65)	32,6 (5,1)	45,4 (4,5)	7,4 (3,76)
	BN (2)	2	25	8,0 (4,0 – 12,0)	23,0 (20,0 – 26,0)	59,0 (52,0 – 66,0)	10,5 (2,0 – 19,0)
	LEW (3)	6	150	8,6 (1,17)	9,1 (2,49)	52,0 (7,2)	30,3 (8,0)
	BN (2)	5	150	8,4 (2,0)	18,4 (4,8)	50,6 (7,9)	22,8 (7,9)
<b>Typ 2</b>	LEW (2)	4	25	19,0 (5,8)	33,5 (6,5)	25,0 (5)	22,5 (5,3)
	BN (3)	4	25	10,5 (1,32)	37,8 (3,6)	23,8 (6,9)	27,9 (10,1)
	LEW (3)	8	150	9,7 (1,38)	17,5 (2,1)	42,3 (5,3)	30,5 (5,6)
	BN (2)	5	150	5,8 (1,4)	33,2 (5,3)	29,4 (4,9)	31,6 (8,4)
<b>Typ 3</b>	LEW (4)	5	25	7,6 (1,03)	55,0 (8,1)	18,6 (4,6)	18,6 (4,9)
	BN (3)	4	25	1,5 (0,95)	64,8 (9,6)	32,5 (8,8)	1,2 (1,2)
	LEW (3)	8	150	9,6 (1,6)	14,3 (2,1)	38,6 (1,7)	37,5 (3,8)
	BN (2)	4	150	3,4 (0,75)	55,8 (8,6)	17,6 (2,6)	23,2 (9,3)



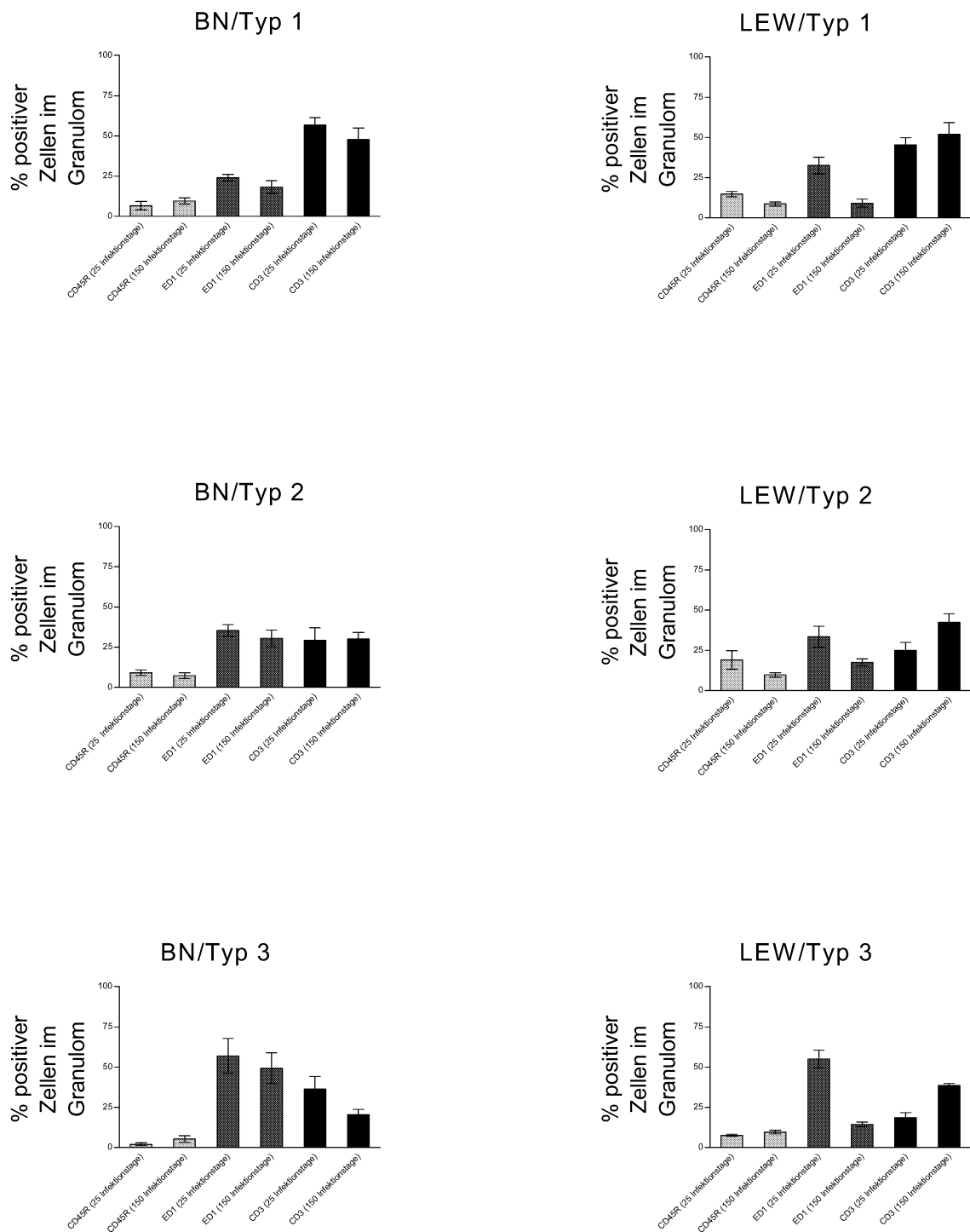
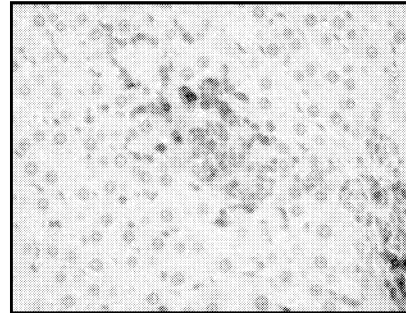
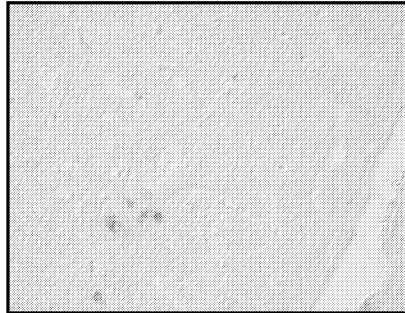


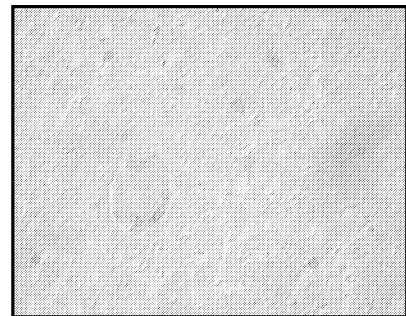
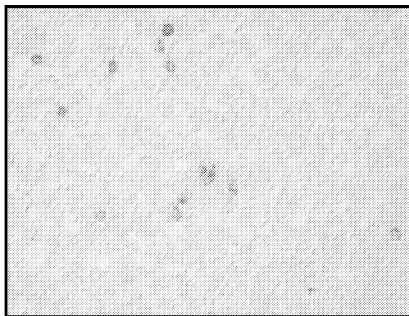
Abb. 6 Prozentuale Verteilung von CD45R<sup>+</sup> (B-Zellen), ED1<sup>+</sup> (Makrophagen) und CD3 (T-Zellen) –Zellen in drei verschiedenen Läsionentypen in der Leber von Lewis- und Brown Norway Ratten (BN = 20, LEW = 19); 25 und 150 Tage nach experimenteller Infektion mit *E. cuniculi*-Sporen. Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler (SEM).

**Lewis-Ratten****Brown Norway-Ratten**

A (CD45R)



B (CD3)



C (ED1)

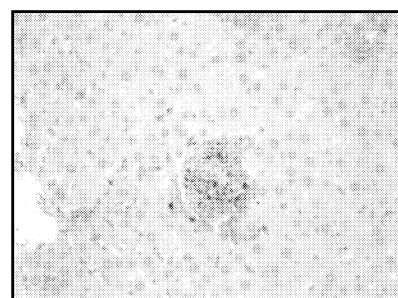
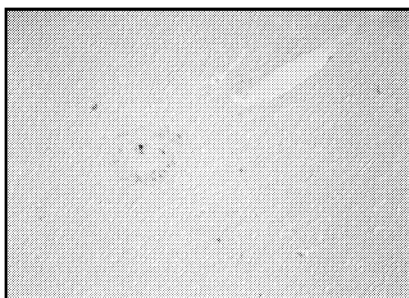


Abb. 7 Nachweis von B-Zellen (A), T-Zellen (B) und Makrophagen (C) in einer Läsion vom Typ 3 in der Leber einer Lewis-Ratte, beziehungsweise einer Brown Norway-Ratte infiziert mit 80 000 *E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten nach 150 Infektionstagen. Immunhistochemische Färbung mit CD45R<sup>+</sup>-, CD3<sup>+</sup>-, ED1<sup>+</sup>- Markern.

## **Verteilung von B-Zellen, Makrophagen und T-Zellen in den Portalfeldern**

Untersucht wurde stichprobenartig jeweils ein Tier pro Rasse und Infektionsdosis zur Gewinnung eines Eindrucks über die Verhältnisse der einzelnen Zelltypen zueinander. Da keine deutlichen Unterschiede feststellbar waren zwischen den einzelnen Rassen, wurde auf eine detaillierte Auswertung verzichtet.

Unabhängig von Rasse, Dosis und Infektionsstadium bestanden die Portalfelder hauptsächlich aus  $CD3^+$ -Lymphozyten. Der Anteil an  $ED1^+$ -Makrophagen variierte in Abhängigkeit der Infektionsdosis, aber nicht der Rasse und dem Infektionsstadium. Zwei Tiere, die mit der hohen Dosis inokuliert wurden, hatten doppelt so viele Makrophagen im Portalgebiet wie zwei mit der niedrigen Dosis infizierte Ratten. Die Anzahl B-Zellen war sehr variabel und schwankte von ganz wenigen bis praktisch die Hälfte der gefärbten Zellen im Portalbereich.

## **$CD45R^+$ -Zellen in der Leber nach *E. cuniculi*-Infektion**

$CD45R^+$  wurde als Marker für B-Zellen eingesetzt und färbt alle Stadien von B-Zellen in der Leber mit Ausnahme von Plasmazellen (Kröse et al., 1986). Untersucht wurde die Menge an  $CD45R^+$ -Zellen in einem Leberschnitt und daraus der prozentuale Anteil der positiven Zellen im Portalgebiet ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefasst, beziehungsweise in den Abbildungen 8 und 9 graphisch dargestellt.

Bei vier Kontrolltieren aus der Gruppe der Lewis-Ratten waren 3,6 positive Zellen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe zählbar. Davon befanden sich 8,8 % im Portalfeld. Nach 25 Infektionstagen wurden bei zwei Lewis-Ratten 6,9 positive Zellen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe mit einem Anteil von 20,5 % im Portalfeld gezählt. Im Verlaufe der Infektion sank der prozentuale Anteil  $CD45R^+$ -Zellen im Portalfeld bei drei untersuchten Lewis-Ratten auf 13 %. Die Gesamtmenge blieb jedoch nahezu konstant (Tab. 8). Diese war nach 150 Infektionstagen signifikant tiefer als bei den Brown Norway-Ratten zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 8).

Zwei Kontrolltiere (Brown Norway) hatten 7,0 positive Zellen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe, und 5 % dieser Zellen befanden sich im Portalgebiet. Nach 25 Infektionstagen liessen sich bei zwei untersuchten Brown Norway-Ratten 9,5 positive Zellen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe zählen. Davon waren 13 % im Portalfeld lokalisiert. Die Menge an  $CD45R^+$ -Zellen erhöhte sich mit

zunehmender Infektionsdauer (Abb. 8). In der späten Infektionsphase, das heisst nach 150 Infektionstagen, waren bei drei Tieren 16,1 positive Zellen/cm<sup>2</sup> Lebergewebe mit dem B-Zell-Marker darstellbar. Davon lagen 29,3 % aller positiven Zellen im Portalbereich und bildeten Anhäufungen von B-Zellen. Solche Cluster wurden bei keiner der anderen Infektionsgruppen gefunden (Abb. 10).

**Tabelle 8:** Anzahl (Mittelwert und Standardfehler, SEM) von CD45R<sup>+</sup>-Zellen und prozentualer Anteil im Portalgebiet in der Leber experimentell mit *E. cuniculi*-Sporen (80 000 *E. cuniculi*-fokusbildender Einheiten) infizierter Lewis- und Brown Norway-Ratten

Ratten-Inzuchtstamm	Zeitpunkt p.i.	Anzahl Tiere (n)	Gesamtzahl CD45R <sup>+</sup> -Zellen in der Leber (Anzahl/cm <sup>2</sup> Lebergewebe)  (SEM)	Prozentualer Anteil im Portalfeld (%)  (SEM)
<b>Lewis (Kontrolltiere)</b>	25 150	2 2	3,6 (0,7)	8,8 (0,6)
<b>Lewis</b>	25	2	6,9 (5,5 – 8,3)	20,5 (20,0 – 21,0)
<b>Lewis</b>	150	3	5,6 (0,3)	13,0 (2,5)
<b>Brown Norway (Kontrolltiere)</b>	150	2	7,0 (6,7 – 7,3)	5,0 (4,0 – 6,0)
<b>Brown Norway</b>	25	2	9,5 (5,5 – 13,4)	13,0 (11,0 – 15,0)
<b>Brown Norway</b>	150	3	16,1 (2,6)	29,3 (1,6)

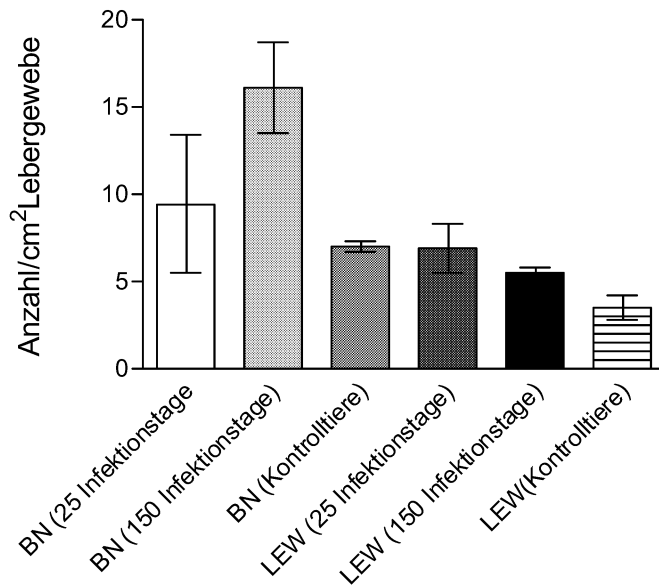


Abb. 8 Anzahl CD45R<sup>+</sup>-Zellen (Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler, SEM) in der Leber von Brown Norway- und Lewis-Ratten (BN = 5, LEW = 5) und Kontrolltiere ohne Infektion (BN = 2, LEW = 4); 25 und 150 Tage nach experimenteller Infektion mit *E. cuniculi*-Sporen (*E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten = 80 000).

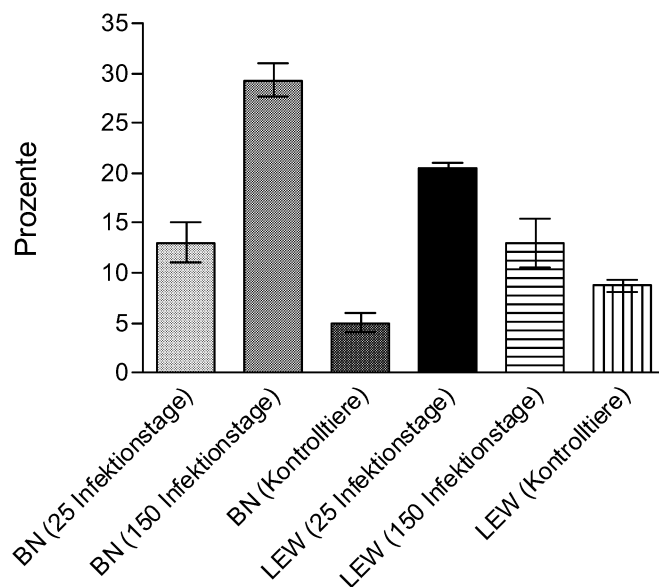


Abb. 9 Prozentualer Anteil an CD45R<sup>+</sup>-Zellen (Arithmetischer Mittelwert und Standardfehler, SEM) im Portalgebiet in der Leber von Brown Norway- und Lewis-Ratten (BN = 5, LEW = 5) und Kontrolltieren ohne Infektion (BN = 2, LEW = 4); 25 und 150 Tage nach experimenteller Infektion mit *E. cuniculi*-Sporen (*E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten = 80 000).

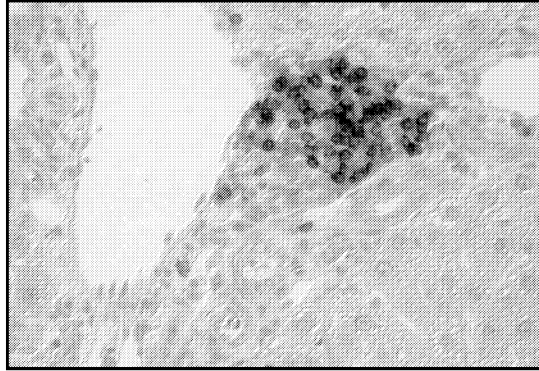


Abb. 10 Anhäufung von B-Zellen im Portalgebiet der Leber einer Brown Norway-Ratte infiziert mit 80 000 *E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten nach 150 Infektionstagen. Immunhistochemische Färbung mittels CD45R<sup>+</sup>-Marker.

### ED1<sup>+</sup>-Zellen in der Leber nach *E. cuniculi*-Infektion

Als Marker für Makrophagen wurde ein ED1-Antikörper verwendet, der ein Epitop auf lysosomalen Membranen von Makrophagen der Ratte erkennt, welches stärker exprimiert wird bei erhöhter Phagozytoseaktivität (Damoiseaux et al., 1994).

Von einem Leberschnitt wurden jeweils so viele Blickfelder ausgewertet, bis 100 ED1<sup>+</sup>-Zellen gezählt waren und mit der Anzahl Hepatozyten in den gleichen Blickfeldern korreliert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt, umgerechnet in Anzahl ED1<sup>+</sup>-Zellen/ 100 Hepatozyten.

Bei drei Kontrolltieren der Brown Norway-Rasse waren 5,2 ED1<sup>+</sup>-Zellen/100 Hepatozyten beziehungsweise 1,5 positive Zellen/100 Hepatozyten bei zwei Lewis-Ratten zählbar.

Während der frühen Infektion, das heisst 25 Tage p.i., stieg die Menge auf 22,7 ED1<sup>+</sup>-Zellen/100 Hepatozyten bei zwei untersuchten Brown Norway-Ratten, die mit 80 000 Ecffu inokuliert waren, im Vergleich zu 11,5 ED1<sup>+</sup> Zellen/100 Hepatozyten bei zwei mit der gleichen Dosis infizierten Lewis-Ratten. Die Gesamtzahl an ED1<sup>+</sup>-Zellen nahm im Laufe der Infektion bei beiden Rassen ab. Nach 150 Infektionstagen wurden bei drei Brown Norway-Ratten noch 12,2 ED1<sup>+</sup>-Zellen/100 Hepatozyten gefunden im Gegensatz zu 3,7 positiven Zellen/100 Hepatozyten bei drei ausgewerteten Lewis-Ratten.

**Tabelle 9:** Anzahl (Mittelwert und Standardfehler, SEM) ED1<sup>+</sup>-Zellen /100 Hepatozyten in der Leber von experimentell mit *E. cuniculi*-Sporen (80 000 *E. cuniculi*-fokusbildende Einheiten) infizierten Brown Norway- und Lewis-Ratten.

Inzuchtstamm	Tierzahl (n)	Tage p. i.	Anzahl ED1 <sup>+</sup> -Zellen pro 100 Hepatozyten (SEM)
<b>Lewis (Kontrolltiere)</b>	<b>2</b>	<b>150</b>	1,5 (1 – 2)
<b>Lewis</b>	<b>2</b>	<b>25</b>	11,5 (11,5 – 11,6)
<b>Lewis</b>	<b>3</b>	<b>150</b>	3,7 (0,21)
<b>Brown Norway (Kontrolltiere)</b>	<b>3</b>	<b>150</b>	5,2 (2,0)
<b>Brown Norway</b>	<b>2</b>	<b>25</b>	22,7 (17,8 – 27, 6)
<b>Brown Norway</b>	<b>3</b>	<b>150</b>	12,2 (0,9)

## 6.2.2 Verteilung von B-Zellen, Makrophagen und T-Zellen in *E. cuniculi*-bedingten Lungenläsionen

Bei den sechs Lewis-Ratten, bei denen Läsionen gefunden wurden (vgl. Kapitel 4.1.5), setzten sich diese hauptsächlich aus  $CD3^+$ -T-Zellen, durchmischt mit einigen  $ED1^+$ -Zellen zusammen, wobei diese Makrophagen von kleiner bis mittlerer Grösse waren. Bei einem hochinfizierten Tier war die Menge an Makrophagen deutlich höher und die Läsion war überdurchschnittlich gross im Vergleich mit den anderen Lewis-Ratten.  $CD45R^+$ -Zellen wurden nur vereinzelt gefunden.

Bei fünf Brown Norway-Ratten (inokuliert mit der niedrigen Infektionsdosis) waren die gefundenen Läsionen vergleichbar mit denjenigen bei Lewis-Ratten. Das heisst, es überwogen  $CD3^+$ -T-Zellen, und es liessen sich nur vereinzelt  $ED1^+$ -Makrophagen von kleiner bis mittlerer Grösse markieren. Bei den sechs Tieren, welche peroral mit der hohen Infektionsdosis inokuliert wurden, war beinahe die Hälfte aller Zellen in der Läsion  $ED1^+$ . Die Makrophagen erschienen gross und deutlich gefärbt. Meistens bildeten sie Verbände, welche von  $CD3^+$ -T-Zellen umgeben waren (Abb. 11). Mehrere granulomatöse Läsionen waren aneinander gelagert.  $CD45R^+$ -Zellen wurden nur vereinzelt gefunden und waren meistens am Rande der Läsion lokalisiert.

Die Herde der zwei nicht infizierten Kontrolltiere waren vergleichbar mit denjenigen der Brown Norway-Ratten, welche mit der hohen Infektionsdosis inokuliert wurden.

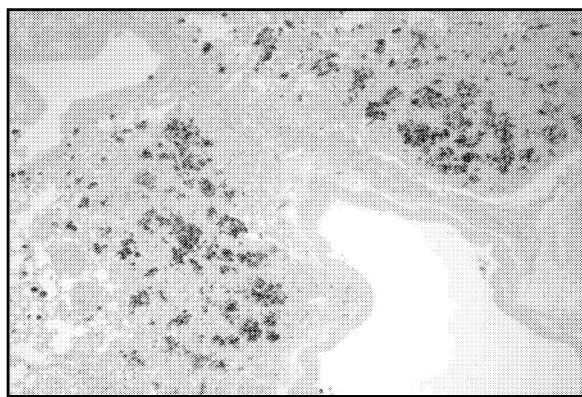


Abb. 11      Läsion in der Lunge einer Brown-Norway-Ratte infiziert mit 80 000 *E. cuniculi*-fokusbildenden Einheiten nach 25 Infektionstagen. Immunhistochemischer Nachweis von  $ED1^+$ -Zellen.



## 7. Diskussion

Die vorliegende Arbeit vergleicht die granulomatösen Läsionen in Ratten nach peroraler Inokulation mit einem aus der Ratte gewonnen Isolat von *E. cuniculi* besonders im Hinblick auf den Einfluss von Rasse und Dosis auf die Infektionsdauer und -intensität. Zu diesem Zwecke wurden 24 Brown Norway-Ratten respektive 20 Lewis-Ratten mit zwei unterschiedlichen Mengen an infektiösen Sporen (80 oder 80 000 Ecffu) infiziert. Die Tiere wurden zu den folgenden Zeitpunkten getötet: 10, 25, 70 und 150 Tage nach peroraler Verabreichung der infektiöser Sporen. Gewebeproben wurden entnommen, formalinfixiert und mittels HE-Färbung auf das Vorkommen (Menge und histologische Charakterisierung) von granulomatösen Läsionen untersucht. Gleichermassen wurden 6 Kontrolltiere jeder Rasse getötet und untersucht. Anschliessend wurden die in Leber- und Lungenschnitten gefundenen Granulome mittels immunhistochemischer Färbungen auf den Gehalt von B- und T-Zellen beziehungsweise Makrophagen geprüft.

Sowohl Brown Norway-Ratten wie auch Lewis-Ratten zeigten einzig Läsionen in Leber und Lunge. Insbesondere waren die Tiere frei von Veränderungen im ZNS und der Niere. Die Anzahl Granulome in der Leber wurde beeinflusst durch den Rattenstamm und die Dosis. Tiere, welche mit der hohen Infektionsdosis inokuliert wurden, zeigten früher histologische Veränderungen und die Läsionen waren während der frühen Infektionsphase deutlich grösser. Die Läsionenmenge hingegen ist nebst von der Dosierung auch von der Rasse abhängig. Brown Norway-Ratten, welche die hohe Infektionsdosis erhielten, hatten bereits nach 25 Infektionstagen eine deutlich höhere Anzahl an Granulomen in der Leber als alle anderen Infektionsgruppen. Diese hohe Anzahl Granulome persistierte während der nächsten 5 Monate. Bei allen anderen Tieren fiel die Anzahl an Granulomen im Verlaufe der Zeit deutlich ab. blieb jedoch noch leicht höher als in den Lebern der Kontrolltiere gefundene Anzahl granulomähnlicher Läsionen.

Histomorphologisch konnten die Granulome in drei verschiedene Stadien eingeteilt werden. In der Frühphase (25 Tage p.i.) waren 50% aller Granulome dem Typ 1 – unorganisierter Zellansammlungen mit hauptsächlich Lymphozyten und vereinzelt Makrophagen und Plasmazellen – zuzuordnen. Bei allen Ratten, welche die tiefe Infektionsdosis erhielten, konnten nach 150 Infektionstagen nahezu alle Granulome diesem Typ 1 zugeteilt werden. Bei Lewis-Ratten, welche die hohe Infektionsdosis erhielten, blieb die prozentuale Verteilung der

einzelnen Läsionstypen in Verläufe der Infektion etwa gleich. Im Unterschied dazu nahm bei Brown Norway-Ratten die Anzahl organisierter Granulome vom chronischen Typ (organisiert, hauptsächlich Makrophagen) zu.

Die Menge und Art der Leberläsionen in Ratten beider Rassen, welche mit der niedrigen Infektionsdosis inokuliert wurden, waren vergleichbar. Daher wurden immunhistochemisch nur die Infektionsgruppen, welche mit 80 000 Ecffu inokuliert wurden, beziehungsweise die nicht infizierten Kontrolltiere miteinander verglichen. In der frühen Infektionsphase bis 25 Tage p.i. bestanden Läsionen vom Typ 1 hauptsächlich aus  $CD3^{+}$ -T-Zellen, Läsionen vom Typ 2 und 3 aus  $ED1^{+}$ -Makrophagen. Dies gilt für beide Rattenstämme. Nach 150 Infektionstagen wurde bei den Brown Norway-Ratten jedoch ein signifikant höherer Anteil an  $ED1^{+}$ -Zellen in den organisierten Läsionen detektiert im Unterschied zu den Granulomen in Lewis-Ratten, wo  $CD3^{+}$ -Zellen vorherrschten. Gleichfalls war ein Unterschied in der Expression des ED1-Oberflächenmarkers deutlich erkennbar. Bei Brown Norway-Ratten wurde nahezu das gesamte Zytoplasma der Makrophagen gleichmässig angefärbt. Lewis-Ratten hingegen zeigten nur noch eine punktuelle Färbung der Makrophagen. Dies im Unterschied zur frühen Infektionsphase, wo die Makrophagen noch eine deutliche Färbung hatten. Weiter war eine Anhäufung von  $CD45R^{+}$ -Zellen (B-Zellen) im Bereich der Portalfelder von Brown Norway-Ratten zu beobachten. Diese bildeten zusammen klusterähnliche Gebilde. Der Gehalt blieb bei Lewis-Ratten während dessen konstant während der gesamten Infektionsdauer, wobei in der frühen Infektionsphase doppelt so viele B-Zellen in den Granulomen gefunden wurden wie bei Brown Norway-Ratten.

In der Lunge konnte nur in der frühen Infektionsphase Läsionen gefunden werden. Bei allen Lewis-Ratten und bei Brown Norway-Ratten inokuliert mit 80 Ecffu bestanden diese hauptsächlich aus T-Zellen und vereinzelt Makrophagen. Einzelne Tiere waren jedoch frei von Veränderungen in der Lunge. Inokulation mit der hohen Infektionsdosis bewirkte bei Brown Norway-Ratten eine verstärkte Reaktion in der Lunge mit Granulomen bestehend aus aktiven Makrophagen, Riesenzellen, neutrophilen Granulozyten und einzelnen Lymphozyten. Vergleichbare Läsionen, das heisst aktivierte Makrophagen und Riesenzellen, wurden nur noch bei zwei Kontrolltieren der Brown Norway Gruppe gefunden.

Infektionen mit *E. cuniculi* bei der Ratte wurden in der Literatur selten erwähnt und meist nur als beschreibende Dokumentation bei zufällig gefundenen Läsionen bei Labortieren (Lainson, 1954; Attwood und Sutton, 1965; Canning, 1967; Grobov et al., 1975; Majeed und Zubaidy, 1982). Läsionen wurden dabei in Gehirn, Nieren, Leber und der Lunge gefunden (Attwood und Sutton, 1965; Canning, 1967). In der vorliegenden Arbeit konnten einzig Läsionen in Leber und Lunge gezeigt werden. Als mögliche Erklärung für diesen Unterschied kommt die Verwendung eines speziellen Isolates, welches aus einer norwegischen Wanderratte gewonnen und mittels PCR als „Maus-Stamm“ indentifiziert werden konnte (Müller-Doblies et al., 2002) in Frage. Bisherige Studien an Ratten beschrieben Infektionen mit nichtklassifizierten Isolaten, welche nicht unbedingt unserem, aus der Ratte stammendem, entsprechen. Einzelne Isolate können verschiedene Spezies infizieren. Dies ist beispielsweise bei Infektionen beim Menschen der Fall. Für Menschen können sowohl Isolate aus Kaninchen als auch solche aus Hunden infektiös sein (Mathis et al., 1997; Snowden et al., 1998). Weiter kann die Applikationsart die Lokalisation der Läsionen in den Organen beeinflussen. Nach peroraler oder intertrachealer Applikation wurden bei Kaninchen nach 31 Infektionstagen häufiger Läsionen in Leber und Lunge gefunden als nach intravenöser Inokulation (Cox et al., 1979). Leberläsionen werden bei praktisch allen mit *E. cuniculi* infizierten Lebewesen beobachtet. Diese sind meist klein und hauptsächlich aus Lymphozyten und wenigen Makrophagen aufgebaut, sowohl im Leberparenchym wie auch in den Portalfeldern lokalisiert (Fuentealba, 1992; Cox, 1979, Khan et al, 1999). Einzig bei CD-8-KO-Mäusen werden grosse Lebergranulome hauptsächlich bestehend aus monozytären Zellen beschrieben (Khan et al., 1999). Veränderungen in der Lunge wurden nur gelegentlich beschrieben. Bei Kaninchen und Mäusen wurden vereinzelt Läsionen nach experimenteller *E. cuniculi*-Infektion in der Lunge gefunden, dies jedoch nur in der frühen Infektionsphase und in kleinerem Ausmass als in anderen Organen (Cox et al., 1979; Scharmann et al., 1986; El Naas et al., 1999).

Das frühe Auftreten der ersten Läsionen– bereits 10 Tage nach peroraler Infektion – in der Leber überrascht. Nach peroraler Infektion bei SCID-Mäusen wurden die ersten Läsionen erst nach 21 Infektionstagen gefunden nach intraperitonealer Infektion jedoch bereits nach 15 Tagen (Koudela, et al., 1993). Dies spricht dafür, dass genügend infektiöse Sporen für die Inokulation verwendet wurden und beide Rattenstämme empfänglich waren für eine Infektion mit diesem *E. cuniculi*-Isolat. Keines der Tiere erkrankte jedoch symptomatisch. Brown Norway-Ratten haben sich jedoch als empfänglicher für eine Infektion mit einer hohen Dosis von *E. cuniculi*-Sporen erwiesen. Sowohl in der frühen als auch in der späten

Infektionsphase waren deutlich mehr und grössere Läsionen zu finden. Brown Norway-Ratten haben die Tendenz mit einer Th2-Immunantwort zu reagieren im Unterschied zu Lewis-Ratten, welche Erreger mit einer Th1-Immunantwort bekämpfen (Groen et al., 1993). In der vorliegenden Arbeit, waren Individuen, welche mit einer Th2-Immunantwort reagieren deutlich empfänglicher. In Mäusen wurde genau das gegenteilige Phänomen nach einer Infektion mit *E. cuniculi* beobachtet. Mäuse, welche eher zu einer Th1-Immunität neigen wie C57BL/6-Mäuse (Reiner und Locksley, 1995), scheinen empfänglicher zu sein als Balb/c-Mäuse (Niederkorn et al., 1981). Der Unterschied könnte daher rühren, dass in der frühen Infektion weniger die Th1/Th2-Ausrichtung der Immunantwort sondern vielmehr eine NK-Zytotoxizität entscheidend ist für die Überwindung der Infektion (Niederkorn et al., 1983). Diese ist vermutlich bei den beiden Mäusestämmen unterschiedlich stark gegen *E. cuniculi* gerichtet, wie dies bei anderen Infektionen mit intrazellulären Parasiten gezeigt werden konnte. C57BL/6-Mäuse zeigen praktisch keine NK-Aktivität in der ersten Infektionswoche und haben daher vermehrt und grössere Läsionen bei einer Infektion mit *Leishmania major* (Reiner und Locksley, 1995). Die Aktivität der natürlichen Killerzellen scheint ausreichend zu sein, durch eine Sezernierung von IFN $\gamma$  und einer daraus bedingten Makrophagenaktivierung leichtere Infektionen zu kontrollieren (Bancroft und Kelly, 1994). Bei einer Infektion mit einer höheren Infektionsdosis, wie es in dieser Arbeit der Fall war, scheint die Infektion nicht alleinig mit einer NK-Aktivität überwunden werden zu können und in der Folge die Th1-Immunantwort der Lewis Ratten effektiver zu sein, eine Infektion mit 80 000 Ecffu kontrollieren zu können. Als entscheidender Faktor für die erhöhte Empfänglichkeit von Brown Norway Ratten im Vergleich zu Lewis Ratten könnte zudem das Vorliegen einer höheren CD4/CD8-Ratio sein. Lewis Ratten weisen prozentual doppelt so viele CD8-T-Zellen wie Brown Norway Ratten in der gesunden Milz auf (Groen et al., 1993). Brown Norway-Ratten haben einen nachgewiesenen Defekt in der Ausbildung von CD8-T-Zellen (Fournie et al., 2001). Die CD8-Zytotoxizität scheint einen wichtigen Einfluss für die Überwindung einer *E. cuniuli*-Infektion bei Mäusen zu haben (Khan et al., 1999; Braunfuchsova et al., 2001). Das Zusammenspiel zwischen CD8-T-Zellen, CD-4-T-Zellen, Makrophagen, B-Zellen und die entsprechenden Zytokine (IFN $\gamma$ , IL-4, IL-10) ist entscheidend für eine erhöhte Empfänglichkeit und die Ausbildung der Granulome in der Leber. Viele Krankheitserreger regen Makrophagen und NK-Zellen zur Produktion von IL-12 und IFN $\gamma$  an, die ihrerseits auf proliferierende CD4-T-Zellen wirken und die Differenzierung zu Th1-Zellen verursachen (Janeway und Travers, 1995). Brown Norway-Ratten hingegen agieren gegen Erreger mit einer verstärkten Th2-Immunantwort. Was soviel bedeutet, dass IL-4 und IL-10 vermehrt

ausgeschüttet werden. Beide Interleukine hemmen die Ausbildung einer Th1-Immunantwort und somit die Aktivierung von Makrophagen. IL-10 kann zudem die Stickoxid-Produktion der Makrophagen hemmen (Cunha et al., 1992). CD8-T-Zellen ihrerseits produzieren hauptsächlich IFN $\gamma$  zur Makrophagenaktivierung, Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen und aktiviert NK-Zellen. Das Persistieren der Granulome in den Lebern der Brown Norway-Ratten könnte durch einen Mangel an IFN $\gamma$  entstanden und bedingt sein durch eine reduzierte Menge an CD8-T-Zellen und einem erhöhten Spiegel an Th2-Interleukinen. Eine mögliche Quelle für IL-10 könnten die in den parasitenbedingten Läsionen zahlreich auftretenden Granulom-Makrophagen sein, was für die granulomatöse Lebererkrankung bei experimentelle Bilharziose gezeigt werden konnte (Stadecker und Villanueva, 1994). Dass IL-10 eine Rolle spielt bei der Infektion mit *E. cuniculi* hatte auch Braunfuchsova 1999 gezeigt. IL-10 konnte bei Balb/c-Mäusen vermehrt nachgewiesen werden. Sie vermutete den Effekt dieses Interleukins jedoch einzig in einer verminderter NK-Aktivierung und somit einer verzögerten IFN $\gamma$ -Ausschüttung (Braunfuchsova et al., 1999).

Granulome reifen über verschiedene Reifungsstadien. Normalerweise geht diese Reifung mit der Zunahme einer Organisation innerhalb des Granulomes einher. Im Anschluss daran werden diese Granulome wiederum mehrheitlich mit Hilfe von Lymphozyten abgebaut (Silva et al., 2000). Die Reifung und Abbau der Granulome in den Lebern der Lewis-Ratten erfolgte nach diesem Schema. Die Entwicklung der Granulome bei den hochinfizierten Brown Norway-Ratten geschah in einem normalen Ausmasse, ein Abbau über ein Lymphozytenstadium blieb jedoch im Rahmen der Beobachtungszeit aus.

Die organisierten Granulome (Läsionen vom Typ 3) bei hochinfizierten Brown Norway-Ratten bestanden auch nach 150 Infektionstagen hauptsächlich aus ED1<sup>+</sup>-Zellen mit einer deutlichen Expression des Oberflächenmarkers im Unterschied zu den gefärbten Makrophagen der Läsionen bei Lewis-Ratten. Bei Brown Norway Ratten wurde nahezu das gesamte Zytoplasma der Makrophagen gleichmässig angefärbt. Lewis Ratten hingegen hatten nur noch eine punktuelle Färbung der Makrophagen im Unterschied zur frühen Infektionsphase. Das ED1-Antigen wird von praktisch allen Makrophagen exprimiert, also auch von Riesenzellen (Dijkstra et al., 1985). Es ist ein Teil der Phagolysosomen-Membran. Die ED1-Expression ist abhängig von der Aktivierung des Makrophagen (Damoiseaux et al., 1994). Daraus lässt sich schliessen, dass die granulomatösen Läsionen in den Lebern der Brown Norway-Ratten noch deutlich aktiver waren als diejenigen der Lewis- Ratten. Die erhöhte Anzahl granulomatöser Läsionen und die erhöhte und aktivere Präsenz von Makrophagen in den Läsionen - in Zusammenhang mit dem erfolgreichen Parasitennachweis - zeigt, dass die Immunantwort der

Brown Norway Ratten nicht ausreichte, um die Parasiten bis zum 150. Infektionstage ausreichend bekämpfen zu können.

Die Bedeutung und die Funktion der B-Zellen in der *E. cuniculi*-Infektion ist unklar, insbesondere die Zunahme und die Anhäufung der B-Zellen in den Portalfeldern der Brown Norway-Ratten. Es handelte sich dabei aber sicher nicht um Plasmazellen, da diese vom Antikörper (Klon HIS24) nicht gefärbt werden. Zudem war die Anzahl positiver Zellen mit  $\kappa\lambda$ -Ketten nicht erhöht (Daten nicht gezeigt). Eine Th2 gelagerte Immunantwort geht mit einer polyklonalen B-Zellstimulierung einher. IL-4 dabei hauptsächlich das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen zur Synthese von IgG1 und IgE. Die humorale Immunantwort ist jedoch bei der Bekämpfung einer *E. cuniculi*-Infektion von sekundärer Bedeutung. Ein IgG-Titer bleibt im Kaninchen lebenslang erhöht und Antikörper haben keinen protektiven Charakter (Schmidt und Shaddock, 1983). Bezüglich der Serologie waren die Ratten beider Stämme vergleichbar. Auch nach 150 Infektionstagen waren erhöht bleibende IgG- und IgM-Spiegel nachweisbar (Müller-Doblies, unpublizierte Resultate), obwohl bei Lewis Ratten zu dem Zeitpunkt keine Läsionen in der Leber zu finden waren. Bei 2 von 3 mit 80 000 Ecffu inokulierten Brown Norway Ratten gelang nach 160 Infektionstagen die Reisolierung des Parasiten aus der Leber beziehungsweise aus dem Gehirn mittels Zellkultur. Bei keiner der mit der gleichen Dosis infizierten Lewis Ratten war dies der Fall (Müller-Doblies, unpublizierte Resultate).

Die erhöhte Anzahl B-Zellen scheint im Zusammenhang mit einer verminderten CD8-T-Zellzahl und einer Th2 gerichteten Immunantwort eher hemmend für eine adäquate Immunabwehr gegen *E. cuniculi* zu sein. Beim Fehlen von B-Zellen (B-Zell-Knockout-Mäuse) reagierten Mäuse nach experimenteller Infektion mit *Schistosoma mansoni* mit einer verstärkten Th1-Immunantwort (Hernandez et al., 1997). Mit *Leishmania donovani* infizierte Mäuse, welche keine B-Zell-Antwort zeigten (KO-Mäuse), waren resistenter als der Wildtyp (Smelt et al., 2000).

Die Entstehung der Lungenläsionen bei den Kontrolltieren ist ungeklärt. Die Kontrolltiere waren während des Infektionsversuches in einem anderen Raum untergebracht und hatten keinen Kontakt zu den infizierten Ratten. Daher kann mit grosser Sicherheit ausgeschlossen werden, dass diese Läsionen durch *E. cuniculi* verursacht wurden, bei keinem dieser Tiere gelang ein positiver Parasitennachweis sowohl in den Läsionen wie auch in weiteren Geweben. Ebenfalls waren die Kontrolltiere frei von Läsionen in anderen Organen, insbesondere der Leber, und auch der Antikörpernachweis im Serum fiel negativ aus. Ähnliche Lungenläsionen sind bei Brown Norway-Ratten beschrieben im Zusammenhang mit

Pestiziden oder experimenteller Einbringung von Pollen in die Atemwege. Diese granulomatösen Entzündungen gingen jedoch auch mit dem Vorkommen von eosinophilen Granulozyten einher (Michielsen et al., Steerenberg et al.), welche im vorliegenden Fall nicht gefunden wurden. Weitere Abklärungen bezüglich anderer möglicher granulomauslösender Substanzen oder Erregern wurden nicht vorgenommen.

Abschliessend bleibt zu sagen, dass Lewis Ratten, welche Tendenz zu einer Th1-abhängigen Immunantwort zeigen, bereits in der frühen Infektionsphase mit einer adäquaten Immunantwort, bestehend aus T-Zellen und Makrophagen, die Infektion genügend eindämmen konnten. Dies zeigt auch ein deutlicherer ED1<sup>+</sup>-Anstieg im Lebergewebe in der frühen Infektionsphase. Brown Norway Ratten reagieren mit einer verzögerten, dafür aber verstärkten und längeranhaltenden ED1<sup>+</sup>-Antwort in der Leber. Diese deutlich stärkere und länger andauernde Makrophagenaktivierung scheint die Infektion kontrollieren zu können. Wobei unklar bleibt, wie lange die Läsionen im Lebergewebe persistieren oder ob die Infektion zu einem späteren Zeitpunkt überwunden wird.

Die vorliegende Arbeit lässt verschiedene Fragen offen. Eine Messung der Interleukine (INF $\gamma$ , IL-4, IL-10) sowohl im Serum wie auch im Gewebe würde über die immunologische Ausrichtung der zwei Rattenstämme im Zusammenhang mit einer *E. cuniculi*-Infektion zusätzliche Auskünfte geben. Zusätzlich interessant wäre eine Differenzierung CD4 und CD8-T-Zellen im Lebergewebe.

Eine weitere Beobachtung der Entwicklung der Granulome über längere Zeitdauer wäre sicherlich wichtig, um so Aufschlüsse darüber zu gewinnen, ob die Granulome in der Leber der Brown Norway-Ratten permanent persistieren oder zu einem späteren Zeitpunkt abgebaut werden.

## 8. Literaturverzeichnis

- Achbarou, A., Ombrouck, C., Gneragbe, T., Charlotte, F., Renia, L., Desporteslivage, I., Mazier, D., 1996. Experimental model for human intestinal microsporidiosis in interferon gamma receptor knockout mice infected by *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasite Immunol* 18, 387-392.
- Aldras, A.M., Orenstein, J.M., Kotler, D.P., Shadduck, J.A., Didier, E.S., 1994. Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 32, 608-612.
- Arnesen, K., Nordstoga, K., 1977. Ocular encephalitozoonosis (nosematosis) in blue foxes. Polyarteritis nodosa and cataract. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 55, 641-651.
- Attwood, H.D., Sutton, R.D., 1965. Encephalitozoon granulomata in rats. *J Pathol Bacteriol* 89, 735-738.
- Auriault, C., Pancre, V., Wolowczuk, I., Asseman, C., Ferru, I., Verwaerde, C., 1996. Cellular immune response and pathology in schistosomiasis. *Parasite* 3, 199-208.
- Bean, A.G., Roach, D.R., Briscoe, H., France, M.P., Korner, H., Sedgwick, J.D., Britton, W.J., 1999. Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underlie the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 162, 3504-3511.
- Bergquist, N.R., Stintzing, G., Smedman, L., Waller, T., Andersson, T., 1984. Diagnosis of encephalitozoonosis in man by serological tests. *Br Med J* 24, 902.
- Bismanis, J.E., 1970. Detection of latent murine nosematosis and growth of *Nosema cuniculi* in cell cultures. *Can J Microbiol* 16, 237-242.
- Bjerkas, I., 1990. Brain and spinal cord lesions in encephalitozoonosis in mink. *Acta Vet Scand* 31, 423-432.
- Bogdan, C., Nathan, C., 1993. Modulation of macrophage function by transforming growth factor beta, interleukin-4, and interleukin-10. *Ann N Y Acad Sci* 685, 713-739.
- Boot, R., Van Knapen, F., Kruijt, B.C., Walvoort, H.C., 1988. Serological evidence for *Encephalitozoon cuniculi* infection (nosemiasis) in gnotobiotic guineapigs. *Lab Anim* 22, 337-342.
- Bosio, C.M., Gardner, D., Elkins, K.L., 2000. Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. *J Immunol* 164, 6417-6425.
- Botha, W.S., Stewart, C.G., Van Dellen, A.F., 1986. Observations on the pathology of experimental encephalitozoonosis in dogs. *J South Afr Vet Ass* 57, 17-24.



- Botha, W.S., Van Dellen, A.F., Stewart, C.G., 1979. Canine encephalitozoonosis in South Africa. *J South Afr Vet Ass* 50, 135-144.
- Braunfuchsova, P., Kopecky, J., Ditrich, O., Koudela, B., 1999. Cytokine response to infection with the microsporidian, *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol* 46, 91-95.
- Braunfuchsova, P., Salat, J., Kopecky, J., 2001. CD8+ T lymphocytes protect SCID mice against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Int J Parasitol* 31, 681-686.
- Cali, A., 1993. Cytological and taxonomical comparison of two intestinal disseminating microsporidiosis. *AIDS* 7, S12-S16.
- Canning, E.U., 1967. Vertebrates as hosts to microsporidia, with special reference to rats infected with *Nosema cuniculi*. *Protozoology (Suppl J Helminthol.)* 2, 197-205.
- Canning, E.U., Lom, J. (1986) *The Microsporidia of Vertebrates*, Academic Press, New York.
- Cox, J.C., Hamilton, R.C., Attwood, H.D., 1979. An investigation of the route and progression of *Encephalitozoon cuniculi* infection in adult rabbits. *J Protozool* 26, 260-265.
- Croppo, G.P., Visvesvara, G.S., Leitch, G.J., Wallace, S., De Groote, M.A., 1997. Western blot and immunofluorescence analysis of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* established in culture from the urine of a patient with AIDS. *J Parasitol* 83, 66-69.
- Cunha, F.Q., Moncada, S., Liew, F.Y., 1992. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the Induction of Nitric Oxid Synthase by Interferon- $\gamma$  in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 182, 1155-1159.
- De Groote, M.A., Visvesvara, G., Wilson, M.L., Pieniazek, N.J., Slemenda, S.B., DaSilva, A.J., Leitch, G.J., Bryan, R.T., Reves, R., 1995. PCR and culture confirmation of disseminated *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with AIDS: successful therapy with albendazole. *J Infect Dis* 171, 1375-1378.
- Del Aguila, C., Moura, H., Fenoy, S., Navajas, R., Lopez-Velez, R., Li, L., Xiao, L., Leitch, G.J., da Silva, A., Pieniazek, N.J., Lal, A.A., Visvesvara, G.S., 2001. In Vitro Culture, Ultrastructure, Antigenic, and Molecular Characterization of *Encephalitozoon cuniculi* Isolated from Urine and Sputum Samples from a Spanish Patient with AIDS. *J Clin Microbiol* 39, 1105-1108.
- Deplazes, P., Mathis, A., Baumgartner, R., Tanner, I., Weber, R., 1996. Immunologic and molecular characterization of *Encephalitozoon*-like microsporidia isolated from humans and rabbits indicate that *Encephalitozoon cuniculi* is a zoonotic parasite. *Clin Infect Dis* 22, 557-559.
- Deplazes, P., Mathis, A., Weber, R., 2000. Epidemiology and zoonotic aspects of Microsporidia of mammals and birds. *Contrib Microbiol* 6, 236-260.
- Desportes-Livage, I., 2000. Biology of Microsporidia. *Contrib Microbiol* 6, 140-165.

- Didier, E.S., 1995. Reactive nitrogen intermediates implicated in the inhibition of *Encephalitozoon cuniculi* (phylum microspora) replication in murine peritoneal macrophages. *Parasite Immunol* 17, 405-412.
- Didier, E.S., 1998. Microsporidiosis. *Clin Infect Dis* 27, 1-7.
- Didier, E.S., Didier, P.J., Friedberg, D.N., Stenson, S.M., Orenstein, J.M., Yee, R.W., Tio, F.O., Davis, R.M., Vossbrinck, C., Millichamp, N., Shadduck, J.A., 1991. Isolation and characterization of a new human microsporidian, *Encephalitozoon hellem* (n. sp.), from three AIDS patients with keratoconjunctivitis. *J Infect Dis* 163, 617-621.
- Didier, E.S., Shadduck, J.A., 1994. IFN- $\gamma$  and LPS induced murine macrophages to kill *Encephalitozoon cuniculi* in vitro. *J Euk Microbiol* 41, 34.
- Didier, E.S., Varner, P.W., Didier, P.J., Aldras, A.M., Millichamp, N.J., Murphey-Corb, M., Bohm, R., Shadduck, J.A., 1994. Experimental microsporidiosis in immunocompetent and immunodeficient mice and monkeys. *Folia Parasitol* 41, 1-11.
- Didier, E.S., Visvesvara, G.S., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., De Groote, M.A., Vossbrinck, C.R., 1996. A microsporidian isolated from an AIDS patient corresponds to *Encephalitozoon cuniculi* III, originally isolated from domestic dogs. *J Clin Microbiol* 34, 2835-2837.
- Didier, E.S., Vossbrinck, C.R., Baker, M.D., Rogers, L.B., Bertucci, D.C., Shadduck, J.A., 1995. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology* 111, 411-421.
- El Naas, A., Revajova, V., Letkova, V., Halanova, M., 1999. Changes in white blood cell count and formation of lesions in mice experimentally infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Acta Vet* 49, 21-28.
- Elliott, D.E., Ragheb, S., Wellhausen, S.R., Boros, D.L., 1990. Interactions between adherent mononuclear cells and lymphocytes from granulomas of mice with schistosomiasis mansoni. *Infect Immun* 58, 1577-1583.
- Enriquez, F.J., Ditrich, O., Palting, J.D., Smith, K., 1997. Simple diagnosis of *Encephalitozoon sp.* microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 35, 724-729.
- Ewringmann, A., 1998. Untersuchungen zur Klinik, Diagnose und Therapie von Infektionen mit *Encephalitozoon cuniculi* beim Heimtierkaninchen. Dissertation, Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere, Fachbereich Veterinärmedizin, Freie Universität Berlin, pp. 131.
- Ewringmann, A., Göbel, T., 1999. Untersuchungen zur Klinik und Therapie der Encephalitozoonose beim Heimtierkaninchen. *Kleintierpraxis* 44, 357-372.
- Fanning, M.M., Peters, P.A., Davis, R.S., Kazura, J.W., Mahmoud, A.A., 1981. Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni*: relationship of genetic background to hepatosplenic disease and modulation. *J Infect Dis* 144, 148-153.

- Fuentealba, I.C., Mahoney, N.T., Shadduck, J.A., Harvill, J., Wicher, V., Wicher, K., 1992. Hepatic lesions in rabbits infected with *Encephalitozoon cuniculi* administered per rectum. *Vet Pathol* 29, 536-540.
- Gannon, J., 1980. The course of infection of *Encephalitozoon cuniculi* in immunodeficient and immunocompetent mice. *Lab Anim* 14, 189-192.
- Gillespie, K.M., Saoudi, A., Kuhn, J., Whittle, C.J., Druet, P., Bellon, B., Mathieson, P.W., 1996. Th1/Th2 cytokine gene expression after mercuric chloride in susceptible and resistant rat strains. *Eur J Immunol* 26, 2388-2392.
- Griffiths, G.M., 1995. The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol* 7, 343-348.
- Grobov, O.F., Karakuimchiani, M.K., Orlova-Sokol'skaia, I.A., 1975. *Nosema sp.* in white rats. *Parazitologiya* 9, 142-146.
- Groen, H., Klatter, F.A., van Petersen, A.S., Pater, J.M., Nieuwenhuis, P., Kampinga, J., 1993. Composition of rat CD4+ resting memory T-cell pool is influenced by major histocompatibility complex. *Transplant Proc* 25, 2782-2783.
- Guscetti, F., Mathis, A., Hatt, J.-M., Deplazes, P., 2003. Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*sanguinus imperator*). *J Med Primatol* 32, 111-119.
- Gutierrez, Y., Maksem, J.A., Reiner, N.E., 1984. Pathologic changes in murine leishmaniasis (*Leishmania donovani*) with special reference to the dynamics of granuloma formation in the liver. *Am J Pathol* 114, 222-230.
- Hartskeerl, R.A., van Gool, T., Schuitema, A.R., Didier, E.S., Terspstra W.J., 1995. Genetic and immunological characterization of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Koller and Orenstein 1993, reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110, 277- 285.
- He, Q., Leitch, G.J., Visvesvara, G.S., Wallace, S., 1996. Effects of nifedipine, metronidazole, and nitric oxide donors on spore germination and cell culture infection of the microsporidia *Encephalitozoon hellem* and *Encephalitozoon intestinalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 179-185.
- Hermanek, J., Koudela, B., Kucerovala, Z., Ditrich, O., Travicek, J., 1993. Prophylactic and therapeutic immune reconstitution of SCID mice infected with *Encephalitozoon cuniculi*. *Folia Parasitol* 40, 287-291.
- Hernandez, H.J., Wang, Y., Stadecker, M.J., 1997. In infection with *Schistosoma mansoni*, B cells are required for T helper type 2 cell responses but not for granuloma formation. *J Immunol* 158, 4832-4837.
- Hollister, W.A., Canning, E.U., Anderson, C.L., 1996. Identification of microsporidia causing human disease. *J Eukaryot Microbiol* 43, 104-105S.

- Hollister, W.S., Canning, E.U., Colbourn, N.I., Aarons, E.J., 1995. *Encephalitozoon cuniculi* isolated from the urine of an AIDS patient, which differs from canine and murine isolates. J Eukaryot Microbiol 42, 367-372.
- Hollister, W.S., Canning, E.U., Willcox, A., 1991. Evidence for widespread occurrence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) in man provided by ELISA and other serological tests. Parasitology 102, 33-43.
- Hoop, R.K., Ehrsam, H., Keller, B., 1993. 10 Jahre Kaninchensektionen - Eine Uebersicht häufiger Krankheits- und Abgangsursachen. Schweiz Arch Tierheilk 135, 211-215.
- Innes, J.R.M., Zeman, W., Frenkel, J.K., Borner, G., 1962. Occult endemic encephalitozoonosis of the central nervous system of mice (Swiss-Bagg-O'Grady strain). J Neuropathol Exp Neurol 21, 519-533.
- Jacobs, M., Brown, N., Allie, N., Gulert, R., Ryffel, B., 2000. Increased resistance to mycobacterial infection in the absence of interleukin-10. Immunology 100, 494-501.
- Janeway, C.A., Travers, P., 1995. Immunologie.- Spektrum Akademischer Verlage Heidelberg. Berlin. Oxford
- Kamogawa, Y., Minasi, L.A., Carding, S.R., Bottomly, K., Flavell, R.A., 1993. The relationship of IL-4- and IFN gamma-producing T cells studied by lineage ablation of IL-4-producing cells. Cell 75, 985-995.
- Katiyar, S.K., Visvesvara, G.S., Edlind, T.D., 1995. Comparison of ribosomal RNA sequences from amitochondrial protozoa: implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. Gene 152, 27-33.
- Khan, I.A., Moretto, M., 1999. Role of gamma interferon in cellular immune response against murine *Encephalitozoon cuniculi* infection. Infect Immun 67, 1887-1893.
- Khan, I.A., Schwartzman, J.D., Kasper, L.H., Moretto, M., 1999. CD8(+) CTLs are essential for protective immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. J Immunol 162, 6086-6091.
- Kouchakji, G.A., 1985. Parasites of four wild rodent species in north-western Switzerland in an area surrounding a laboratory animal breeding institute. Dissertation, Philosophische und Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Basel
- Koudela, B., Vitovec, J., Kucerova, Z., Ditrich, O., Travnicek, J., 1993. The severe combined immunodeficient mouse as a model for *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis. Folia Parasitol 40, 279-286.
- Kucerova-Pospisilova, Z., Ditrich, O., 1998. The serological surveillance of several groups of patients using antigens of *Encephalitozoon hellem* and *E. cuniculi* antibodies to microsporidia in patients. Folia Parasitol 45, 108-112.
- Kunstyr, I., Lev, L., Naumann, S., 1986. Humoral antibody response of rabbits to experimental infection with *Encephalitozoon cuniculi*. Vet Parasitol 21, 223-232.

- Lainson, R., 1954. Natural infection of *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of laboratory rats. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48, 5.
- Levaditi, C., Nicolau, S., Schoen, R., 1923. Eine Mikrosporidie, *Encephalitozoon cuniculi*, als Erreger der epizootischen Encephalitis des Kaninchens. *Schweiz Med Wschr*, 149-151.
- Liu, J.J., Greeley, E.H., Shadduck, J.A., 1988. Murine Encephalitozoonosis: the effect of age and mode of transmission on occurrence of infection. *Lab Anim Sci* 38, 675-679.
- Maggi, E., Parronchi, P., Manetti, R., Simonelli, C., Piccinni, M.P., Rugiu, F.S., De Carli, M., Ricci, M., Romagnani, S., 1992. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 148, 2142-2147.
- Majeed, S.K., Zubaidy, A.J., 1982. Histopathological lesions associated with *Encephalitozoon cuniculi* (nosematosis) infection in a colony of Wistar rats. *Lab Anim* 16, 244-247.
- Margileth, a.M., Strano, A.J., Chandra, R., Neafie, R., Blum, M., McCully, R.M., 1973. Disseminated nosematosis in an immunologically compromised infant. *Arch Pathol* 95, 145-150.
- Mathis, A., 2000. Microsporidia: emerging advances in understanding the basic biology of these unique organisms. *Int J Parasitol* 30, 795-804.
- Mathis, A., Akerstedt, J., Tharaldsen, J., Odegaard, O., Deplazes, P., 1996. Isolates of *Encephalitozoon cuniculi* from farmed blue foxes (*Alopex lagopus*) from Norway differ from isolates from Swiss domestic rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Parasitol Res* 82, 727-730.
- Mathis, A., Breitenmoser, A.C., Suter, C., Guscetti, F., Weber, R., Deplazes, P. (1998) Are microsporidia zoonotic? Animal host and genetic heterogeneity of microsporidian species infecting humans. In: *ICOPA IX* (Tada, I. et al., eds.), Moduzzi Editore, Bologna, pp. 723-727.
- Mathis, A., Michel, M., Kuster, H., Muller, C., Weber, R., Deplazes, P., 1997. Two *Encephalitozoon cuniculi* strains of human origin are infectious to rabbits. *Parasitology* 114, 29-35.
- Matsubayashi, M., Koike, T., Mikata, I., Takei, H., Hagiwara, S., 1959. A case of Encephalitozoon-like body infection in man. *Arch Pathol* 67, 181-187.
- Mc Innes, E.F., Stewart, C.G., 1991. The pathology of subclinical infection of *Encephalitozoon cuniculi* in canine dams producing pups with overt encephalitozoonosis. *J South Afr Vet Ass* 62, 51-54.
- Mc Cully, R.M., Van Dellen, A.F., Basson, P.A., Lawrence, J., 1978. Observations on the pathology of canine microsporidiosis. *Onderstepoort J Vet Res* 45, 75-92.
- Medina, E., North, R.J., 1998. Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. *Immunology* 93, 270-274.

- Mertens, R.B., Didier, E.S., Fishbein, M.C., Bertucci, D.C., Rogers, L.B., Orenstein, J.M., 1997. *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis: infection of the brain, heart, kidneys, trachea, adrenal glands, and urinary bladder in a patient with AIDS. *Mod Pathol* 10, 68-77.
- Michielsen, C., Zeamari, S., Leusink-Muis, A., Vos J., Bloksma, N., 2002. The environmental pollutant hexachlorobenzene causes eosinophilic and granulomatous inflammation and in vitro airways hyperreactivity in the Brown Norway rat. *Arch Toxicol* 76, 236-47.
- Mohn, S.F., Nordstoga, K., Krogsrud, J., Helgebostad, A., 1974. Transplacental transmission of *Nosema cuniculi* in the blue fox (*Alopex lagopus*). *Acta Path Microbiol Scand Section B* 82, 299-300.
- Moretto, M., Casciotti, L., Durell, B., Khan, I.A., 2000. Lack of CD4(+) T cells does not affect induction of CD8(+) T-Cell immunity against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *Infect Immun* 68, 6223-6232.
- Moretto, M., Durell, B., Schwartzman, J.D., Khan, I.A., 2001. Gamma delta T cell-deficient mice have a down-regulated CD8+ T cell immune response against *Encephalitozoon cuniculi* infection. *J Immunol* 166, 7389-7397.
- Müller, C., 1998. Untersuchungen zur Diagnostik, Biologie und Verbreitung von Microsporidien bei Kaninchen und anderen Tierarten. Dissertation, Institut für Parasitologie, Universität Zürich, pp. 110.
- Müller Doblies, U., Herzog, K., Tanner, I., Mathis, A., Deplazes, P., 2002. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Vet Parasitol* 107, 279.
- Nieder Korn, J.Y., Brieland, J.K., Mayhew, E., 1983. Enhanced natural killer cell activity in experimental murine encephalitozoonosis. *Infect Immun* 41, 302-307.
- Nieder Korn, J.Y., Shadduck, J.A., Schmidt, E.C., 1981. Susceptibility of selected inbred strains of mice to *Encephalitozoon cuniculi*. *J Infect Dis* 144, 249-253.
- Nordstoga, K., 1972. Nosematosis in blue foxes. *Nord Vet Med* 24, 21-24.
- Pleshinger, J., Weidner, E., 1985. The microsporidian spore invasion tube. IV. Discharge activation begins with pH-triggered Ca<sup>2+</sup> influx. *J Cell Biol* 100, 1834-1838.
- Prata, A., 1982. Infection with *S. mansoni*. In: Schistosomiasis, William Heinemann medical books Ltd., London.
- Ragheb, S., Boros, D.L., 1989. Characterization of granuloma T lymphocyte function from *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Immunol* 142, 3239-3246.
- Reiner, S.K.; Locksley, R.M., 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Ann Rev Immunol* 13, 151-177.

- Roach, D.R., Briscoe, H., Baumgart, K., Rathjen, D.A., Britton, W.J., 1999. Tumor necrosis factor (TNF) and a TNF-mimetic peptide modulate the granulomatous response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in vivo. *Infect Immun* 67, 5473-5476.
- Robinson, J.J., 1954. Common infectious disease of laboratory rabbits questionnaire attributed to *encephalitozoon cuniculi*. *Arch Pathol* 58, 71-84.
- Roitt, I.M., Brostoff, J., Male, D. (1984) *Immunology*, Gower Medical Publishing, Philadelphia und New York.
- Rossi, P., G. La Rosa, A. Ludovisi, A. Tamburini, M.A. Gomez Morales, E. Pozio., 1998. Identification of a human isolate of *Encephalitozoon cuniculi* type I from Italy. *Int J Parasitol* 28, 1361-1366.
- Scharmman, W., Reblin, L., Griem, W., 1986. Untersuchungen über die Infektion von Kaninchen durch *Encephalitozoon cuniculi*. *Berl Münch Tierärztl Wschr* 99, 20-25.
- Schmidt, E.C., Shadduck, J.A., 1983. Murine Encephalitozoonosis model for studying the host-parasite relationship of a chronic infection. *Infect Immun* 40, 936-942.
- Shadduck, J.A., Pakes, S.P., 1971. Encephalitozoonosis (nosematosis) and toxoplasmosis. *Am J Pathol* 64, 657-671.
- Shadduck, J.A., Watson, W.T., Pakes, S.P., Cali, A., 1979. Animal infectivity of *Encephalitozoon cuniculi*. *J Parasitol* 65, 123-129.
- Smelt, S.C., Cotterell, S.E., Engwerda, C.R., Kaye, P.M., 2000. B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol* 164, 3681-3688.
- Sprague, V., Becnel, J.J., Hazard, E.I., 1992. Taxonomy of phylum microspora. *Crit Rev Microbiol* 18, 285-395.
- Stadecker, M.J., Flores Villanueva, P.O., 1994. Accessory Signals Regulate Th-Cell Response: from Basic Immunology to a Model of Helminthic Disease. *Immunol Today* 15, 571-574.
- Steerenberg, P.A., Dormans, J.A., van Doorn, C.C., Middendorp, S., Vos, J.G., van Loveren, H., 1999. A pollen model in the rat for testing adjuvant activity of air pollution components. *Inhal Toxicol* 11, 1109-22.
- Stewart, C.G., Botha, W.S., 1989. Canine encephalitozoonosis. *Zimbabwe Vet J* 20, 89-93.
- Suter, C., Müller-Doblies, U.U., Hatt, J.M., Deplazes, P., 2001. Prevention and treatment of *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits with fenbendazole. *Vet Rec* 148, 478-480.
- Swain, S.L., Weinberg, A.D., English, M., Huston, G., 1990. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 145, 3796-3806.

- Szabo, J.R., Shadduck, J.A., 1987. Experimental encephalitozoonosis in neonatal dogs. *Vet Pathol* 24, 99-108.
- Terada, S., Reddy, K.R., Jeffers, L.J., Cali, A., Schiff, E.R., 1987. Microsporidian hepatitis in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Int Med* 107, 61-62.
- Van Dellen, A.F., Botha, W.S., Boomker, J., Warnes, W.E.J., 1978. Light and electron microscopical studies on canine encephalitozoonosis: cerebral vasculitis. *Onderstepoort J Vet Res* 45, 165-186.
- Van Heerden, J., Bainbridge, N., Burroughs, R.E., Kriek, N.P., 1989. Distemper-like disease and encephalitozoonosis in wild dogs (*Lycaon pictus*). *J Wildl Dis* 25, 70-75.
- Van Rensburg, I.B.J., Du Plessis, J.L., 1971. Nosematosis in a cat: a case report. *J South Afr Vet Ass* 42, 327-331.
- Vordermeier, H.M., Venkataprasad, N., Harris, D.P., Ivanyi, J., 1996. Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. *Clin Exp Immunol* 106, 312-316.
- Waller, T., Morein, B., Fabiansson, E., 1978. Humoral immune response to infection with *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits. *Lab Anim* 12, 145-148.
- Weber, R., Bryan, R.T., 1994. Microsporidial infections in immunodeficient and immunocompetent patients. *Clin Inf Dis* 19, 517-521.
- Weber, R., Deplazes, P., Flepp, M., Mathis, A., Baumann, R., Sauer, B., Kuster, H., Luthy, R., 1997. Cerebral microsporidiosis due to *Encephalitozoon cuniculi* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 336, 474-478.
- Weber, R., Deplazes, P., Schwartz, D., 2000. Diagnosis and clinical aspects of human microsporidiosis. *Contrib Microbiol* 6, 166-192.
- Weidner, E., Findley, A.M., Dolgikh, V., Sokolova, J., 1999. Microsporidian biochemistry and physiology. In: Wittner, M.(Ed.), *The Microsporidia and Microsporidiosis*. ASM Press, Washington D.C, pp. 172-195.
- Weinstock, J.V., Boros, D.L., 1983. Modulation of granulomatous hypersensitivity. VI. T lymphocyte subsets influence mast cell density in liver granulomas of *Schistosoma mansoni*- infected mice. *J Immunol* 131, 959-961.
- Weiss, L.M., Zhu, X., Cali, A., Tanowitz, H.B., Wittner, M., 1994. Utility of microsporidian rRNA in diagnosis and phylogeny. *Folia Parasitol* 41, 81-90.
- Weiss, L.M., Ma, Y.F., Takvorian, P.M., Tanowitz, H.B., Wittner, M., 1998. Bradyzoite development in *Toxoplasma gondii* and the hsp 70 stress response. *Infect Immun* 66, 3295-3302.



- Wenker, C.J., Hatt, J.-M., Ziegler, D., Mathis, A., Tanner, I., Deplazes, P., 2002. Microsporidiosis (*Encephalitozoon* spp.) of new world primates - an emerging disease? A seroepidemiological, pathological, and therapeutical survey in the Zurich zoo. EAZWV, 4th scientific meeting, May 8-12, Heidelberg, Germany.
- Wilson, J.M., 1979. The biology of *Encephalitozoon cuniculi*. Med Biol 57, 84-101.
- Wosu, N.J., Olsen, R., Shadduck, J.A., Koestner, A., Pakes, S.P., 1977. Diagnosis of experimental encephalitozoonosis in rabbits by complement fixation. J Infect Dis 135, 944-948.
- Zeman, D.H., Baskin, G.B., 1985. Encephalitozoonosis in squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). Vet Pathol 22, 24-31.
- Zender, H.O., Arrigoni, E., Eckert, J., Kapanci, Y., 1989. A case of *Encephalitozoon cuniculi* peritonitis in a patient with AIDS. Am J Clin Pathol 92, 352-356.
- Zhou, Z.-y., Nordstoga, K., 1993. Mesangioproliferative glomerulonephritis in mink with Encephalitozoonosis. Acta Vet Scand 34, 69-76.

## 9. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen danken, welche zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gilt:

Dem Referenten Herrn Prof. Dr. P. Deplazes für die Hilfe und Geduld bei der Abfassung des Manuskriptes

Herrn Prof. Dr. F. Ehrensperger für die Beurteilung der Arbeit im Korreferat

Dr. med. vet. Uwe Müller-Doblies für die Idee zur Dissertation, die fachliche Unterstützung während der Datenerhebung und -auswertung sowie der unermüdlichen Diskussionsbereitschaft

Den MitarbeiterInnen des Institutes für Pathologie insbesondere Frau Kati Zlinsky und Frau Dr. Monika Hilbe für die technische Anleitung bei der Erstellung der immunhistochemischen Färbungen

Herrn Dr. Adrian Hehl für die Hilfe bei der Erstellung und Verarbeitung des Bildmaterials.

Herrn Dr. Alexander Mathis für den „letzten Schliff“.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Institutes für Parasitologie für die fachlichen und auch weniger fachlichen Diskussionen und die Freundschaft.

## Lebenslauf

Name: Kathrin Herzog  
Geburtsdatum: 30.7.1973  
Geburtsort: Richterswil  
Nationalität: Schweiz  
Heimatort: Wölflinswil

1980 – 1986 Primarschule Wollerau  
1986 – 1988 Sekundarschule Wollerau  
1988 – 1993 Wirtschaftsgymnasium Pfäffikon/SZ  
1993 Maturität Typus E

1993 – 1998 Studium der Veterinärmedizin an der Universität Zürich, Schweiz  
1998 Staatsexamen Veterinärmedizin an der Universität Zürich, Schweiz

1999 – 2000 Assistentin Kleintierpraxis Dr. med. vet. E. Buff, Frauenfeld  
2000 – 2001 Doktorandin am Institut für Parasitologie, Zürich  
2002 – 2003 Assistentin Kleintierpraxis Dr. med. vet. E. Buff, Frauenfeld  
2003 – 2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Bogar AG, Wallisellen  
2005 – Eigene Kleintierpraxis für Tierphysiotherapie, Wittenwil  
2005 – Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Diavet AG, Bäch

21.7.2005